



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa viridiflora* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA”

Trabajo de Titulación:

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: CINTHIA GEOVANNA ERAZO DELGADO

DIRECTORA: Lcda. KAREN ACOSTA LEÓN M. Sc

Riobamba- Ecuador

2019

©2019, Cinthia Geovanna Erazo Delgado

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Cinthia Geovanna Erazo Delgado, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 03 de diciembre de 2019



CINTHIA GEOVANNA ERAZO DELGADO

100316909-9

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación, tipo: investigación, **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Phaedranassa viridiflora* SOBRE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA”**, realizado por la señorita **CINTHIA GEOVANNA ERAZO DELGADO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Verónica Mercedes Cando Brito., M.Sc PRESIDENTA DEL TRIBUNAL		03-12-2019
Lcda. Karen Liseth Acosta León., M.Sc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		03-12-2019
BQF. Diego Renato Vinuesa Tapia., M.Sc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		03-12-2019

DEDICATORIA

A mis padres, Berenice y Fabian, por su amor infinito, apoyo, dedicación y sacrificio.

A mi ángel en el cielo, Leonor, por acompañarme a cada instante.

A mi hermana Karen por brindarme su apoyo incondicional, por la paciencia, la ternura y por impulsarme a seguir cada día. A ti Andy por tus constantes palabras de aliento.

Cinthia Geovanna

AGRADECIMIENTO

Por siempre, gracias. Gracias a mis padres porque sin sus abrazos no lo hubiera logrado. Han sido mi guía, mi luz, mi punto de energía, mi paz, y mis mayores sonrisas desde siempre. A mis hermanos porque confiaron en mí desde el día cero. A mis sobrinos por existir.

De corazón, millones de gracias a Karen Acosta y Gisela Pilco por ser tan buenas personas, fuera y dentro de la carrera, porque sin su ayuda de manera incondicional, no lo hubiera conseguido. A Diego Vinueza por el apoyo y su conocimiento.

Y a todos los que estuvieron en algún momento durante este camino que con su amistad hicieron que este día llegue.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	12
ÍNDICE DE ANEXOS	13
RESUMEN.....	14
SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	16

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO	20
1.1 FAMILIA AMARYLLIDACEAE	20
<i>1.1.1 Familia Amaryllidaceae en Ecuador.....</i>	<i>21</i>
<i>1.1.2 Género Phaedranassa</i>	<i>22</i>
<i>1.1.3 Phaedranassa viridiflora.....</i>	<i>22</i>
<i>1.1.3.1 Descripción.....</i>	<i>22</i>
<i>1.1.3.2 Taxonomía</i>	<i>23</i>
<i>1.1.3.3 Hábitat.....</i>	<i>24</i>
<i>1.1.4 Alcaloides en la familia Amaryllidaceae</i>	<i>25</i>
1.2 ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER.....	26
<i>1.2.1 Descripción.....</i>	<i>26</i>
<i>1.2.1.1 Etapas de la enfermedad</i>	<i>26</i>
<i>1.2.1.2 Clasificación de acuerdo a la edad</i>	<i>27</i>
<i>1.2.2 Descubrimiento de la enfermedad</i>	<i>27</i>
<i>1.2.3 Etiología de la enfermedad del Alzheimer.....</i>	<i>28</i>
<i>1.2.3.1 Introducción.....</i>	<i>28</i>
<i>1.2.3.2 Neurotransmisión colinérgica</i>	<i>28</i>
<i>1.2.3.3 Enzimas colinesterasas.....</i>	<i>29</i>
<i>1.2.3.4 Plegamiento anómalo y agregación de proteínas</i>	<i>30</i>

1.2.4	<i>Sintomatología</i>	31
1.2.5	<i>Diagnóstico</i>	31
1.2.6	<i>Tratamiento farmacoterapéutico</i>	32
1.2.6.1	<i>Inhibidores de Colinesterasas</i>	34
1.2.6.2	<i>Antagonismo del receptor N-metil-D-aspartato (receptor NMDA)</i>	35
1.3	MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE ELLMAN	36
1.4	CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)	
	37	

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	38
2.1	POBLACIÓN DE ESTUDIOS	38
2.2	TAMAÑO DE LA MUESTRA	38
2.3	LUGAR DE RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	38
2.4	LUGAR DE INVESTIGACIÓN	39
2.5	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	39
2.5.1	<i>Materiales</i>	39
2.5.2	<i>Equipos</i>	40
2.5.3	<i>Reactivos</i>	41
2.6	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	42
2.7	IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA	42
2.8	EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES	42
2.9	ANÁLISIS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)	43
2.10	PREPARACIONES PARA EL ENSAYO DE MICROPLACA PARA LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE AChE Y BuChE	43
2.10.1	<i>Preparación de soluciones</i>	43
2.10.2	<i>Preparación de sustrato</i>	44
2.10.3	<i>Acondicionamiento de enzimas</i>	44
2.10.4	<i>Compuesto de referencia galantamina</i>	44
2.10.5	<i>Diluciones del extracto de alcaloides de <i>Phaedranassa viridiflora</i></i>	45
2.11	INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE ACETIL- Y BUTIRILCOLINESTERASA	46
2.12	ANÁLISIS DE DATOS	46
2.13	CURVA DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA PARA CALCULAR EL IC₅₀	47

CAPITULO III

3.	MARCO DE ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES	48
3.1	EXTRACTO DE ALCALOIDES DE <i>PHAEDRANASSA VIRIDIFLORA</i>	48
3.2	CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)	49
3.3	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE <i>PHAEDRANASSA VIRIDIFLORA</i> SOBRE AChE Y BuChE	52
3.3.1	<i>Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides sobre acetilcolinesterasa</i>	53
3.3.1.1	<i>Prueba 1: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides disuelto en metanol</i>	53
3.3.1.2	<i>Prueba 2: actividad inhibitoria del extracto de alcaloides disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)</i>	55
3.3.2	<i>Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides sobre butirilcolinesterasa</i>	56
3.3.2.1	<i>Prueba 1: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides disuelto en metanol</i>	56
3.3.2.2	<i>Prueba 2: actividad inhibitoria del extracto de alcaloides disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)</i>	59
3.3.2.3	<i>Generalizado</i>	60
	CONCLUSIONES.....	63
	RECOMENDACIONES.....	64
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Taxonomía de <i>Phaedranassa viridiflora</i>	23
Tabla 2-1 Materiales empleados	39
Tabla 2-2 Equipos utilizados durante la investigación.....	40
Tabla 2-3 Reactivos utilizados	41
Tabla 2-4 Diluciones y concentraciones de galantamina empleadas en los ensayos de inhibición de AChE y BuChE	45
Tabla 3-1 Rendimiento de los extractos alcaloidales de las dos variedades de la especie <i>Phaedranassa viridiflora</i>	48
Tabla 3-2 Identificación de alcaloides mediante CG-EM de los extractos alcaloidales de <i>P. viridiflora</i> de variedad amarilla y naranja.....	49
Tabla 3-3 Porcentajes iniciales de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales sobre AChE. Primer análisis.....	53
Tabla 3-4 Porcentajes de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales sobre AChE. Segundo análisis.....	54
Tabla 3-5 Actividad de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales de las dos variedades de <i>P. viridiflora</i> y galantamina, ensobre AChE. Segundo análisis	54
Tabla 3-6 Porcentajes de inhibición enzimática de los extractos sobre AChE disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)	55
Tabla 3-7 Valores de IC ₅₀ de <i>P. viridiflora</i> y galantamina sobre la inhibición de AChE disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)	56
Tabla 3-8 Porcentajes iniciales de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales sobre BuChE. Primer análisis	57

Tabla 3-9 Porcentajes de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales sobre BuChE. Segundo análisis.....	57
Tabla 3-10 Actividad de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales de las dos variedades de <i>P. viridiflora</i> y galantamina, sobre BuChE. Segundo análisis	58
Tabla 3-11 Porcentajes de inhibición enzimática de los extractos sobre BuChE disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)	59
Tabla 3-12 Valores de IC ₅₀ de <i>P. viridiflora</i> y galantamina, sobre la inhibición de BuChE disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V).....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Distribución de la familia Amaryllidaceae alrededor del mundo	21
Figura 1-2 <i>Phaedranassa viridiflora</i>	22
Figura 1-3 <i>P. viridiflora</i> de flores amarillas y posible híbrido <i>P. dubia</i> x <i>P. viridiflora</i> , de flores naranjas respectivamente	23
Figura 1-4 Mapa de ubicación de <i>Phaedranassa viridiflora</i>	24
Figura 1-5 Alcaloides de la familia Amaryllidaceae	25
Figura 1-6 Diagrama sistemático de una sinapsis colinérgica generalizada.....	29
Figura 1-7 Comparación de TAC	32
Figura 1-8 Fármacos inhibidores de la colinesterasa usados en el tratamiento	33
Figura 1-9 Sucesión de reacciones que conforman el método de Ellman para la determinación de la actividad de AChE	36
Figura 3-1 Estructuras de alcaloides presentes en el bulbo de <i>P. viridiflora</i> de variedad amarilla y naranja.....	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 3-1 Cantidad de alcaloides de los extractos alcaloidales de las variedades de <i>P. viridiflora</i> amarilla y naranja (µg gal/100 mg PS)	50
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A** Recolección del material vegetal
- Anexo B** Acondicionamiento del material vegetal
- Anexo C** Proceso de extracción de alcaloides
- Anexo D** Preparación de reactivos
- Anexo E** Microplaca de 96 pocillos después del ensayo in-vitro
- Anexo F** Curva de inhibición de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora* de variedad amarilla
- Anexo G** Curva de inhibición de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora* de variedad naranja
- Anexo H** Contrato marco de acceso a los recursos genéticos
- Anexo I** Contrato marco de acceso a los recursos genéticos

RESUMEN

El objetivo general consistió en determinar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa. La familia *Amaryllidaceae* es extensamente estudiada por sus alcaloides, los cuales presentan importantes actividades fisiológicas, incluyendo su uso en el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer. Dado los escasos estudios sobre la especie endémica *Phaedranassa viridiflora*. Para ello, se llevó a cabo la extracción de alcaloides del bulbo de las variedades de *Phaedranassa viridiflora*, usando solventes orgánicos y cambios de pH. La identificación de sus alcaloides se realizó mediante el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El método de Ellman et al. (1996), con algunas modificaciones de Ortiz et al. (2016) fue usado para verificar su actividad de inhibición frente a la enzima acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, usando el compuesto galantamina como marcador de referencia. En la especie *P. viridiflora* de floramarilla se identificaron alcaloides de tipo hemantamina, homolicorina y tazetina, mientras que en la especie *P. viridiflora* de flor naranja hubo alcaloides como hemantamina, tazetina, galantamina, licorina, incartina y galantina. Los resultados de la variedad naranja de *P. viridiflora* mostraron una alta actividad inhibitoria sobre AChE presentando un valor de $IC_{50} = 1,02 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, similar al control galantamina (AChE $IC_{50} = 0,57 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$). La actividad inhibitoria sobre BuChE fue moderadamente alta, presentando un valor de IC_{50} de $84,28 \pm 4,28 \mu\text{g/mL}$ y, el control galantamina mostró valores de IC_{50} de $13,53 \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$. En el caso de la variedad amarilla de *P. viridiflora* mostró una alta actividad de inhibición sobre AChE ($7,82 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$) y una actividad baja sobre BuChE ($125,51 \pm 3,03 \mu\text{g/mL}$). Por lo tanto, la variedad naranja de *Phaedranassa viridiflora* fue la que presentó mejor actividad. Como consecuencia, ambas variedades podrían ser consideradas como objetivo en la búsqueda de nuevos inhibidores de colinesterasas.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <PRODUCTOS NATURALES>, <ENFERMEDAD ALZHEIMER>, <INHIBICIÓN COLINESTERASAS>, <ACHE (ENZIMA)>, <BUChE (ENZIMA)>, <*Phaedranassa viridiflora*>, < ELLMAN (MÉTODO) >



SUMMARY

The general objective was to determine the inhibitory activity of the alkaloid extract on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. The Amaryllidaceae family is extensively studied for its alkaloids, which have important physiological activities, including their use in the treatment of Alzheimer's disease. Given the few studies on the endemic species *Phaedranassa viridiflora*. For this, the extraction of bulb alkaloids of the varieties of *Phaedranassa viridiflora* was carried out, using organic solvents and pH changes. The identification of its alkaloids was carried out by gas chromatography analysis coupled to mass spectrometry (CG-MS). The method of Ellman et al., (1996), with some modifications by Ortiz et al. (2016) was used to verify its inhibition activity against the enzyme acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase using galanthamine compound as a reference marker. In the *P.viridiflora* species, yellow flower, haemantamine homolcorina and tazetina alkaloids were identified, while in the orange flower of *P.viridiflora* there alkaloids such as haemantamine, tazetina, galantamine, lycorine, incartina and galantine. The results of the orange variety of *Phaedranassa viridiflora* showed a very high inhibitory activity on AChE presenting an IC₅₀ value = $1,02 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, like the galantamine control (IC₅₀ = $0,57 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$). the inhibitory activity on BuChE was moderately high, presenting an IC₅₀ value of $84,28 \pm 4,28 \mu\text{g/mL}$, and the galantamine control showed IC values of $13,53 \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$. in the case of the yellow variety of *Phaedranassa viridiflora*, it showed a high inhibitory activity on AChE ($7,82 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$) and low activity on BuChE ($125,51 \pm 3,03 \mu\text{g/mL}$). Therefore, the orange variety of *Phaedranassa viridiflora*, was the one with the best activity. Therefore, both varieties could be considered as objective in the search for new cholinesterase inhibitors.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <NATURAL PRODUCTS>, <ALZHEIMER DISEASE>, <CHOLINESTERASE INHIBITION>, <ACHE (ENZYME)>, <BUChE (ENZYME)>, <*Phaedranassa viridiflora*>, <ELLMAN (METHOD)>.



INTRODUCCIÓN

La enfermedad del Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo irreversible del sistema nervioso central caracterizado por una disminución neuronal progresiva en ciertas zonas del cerebro (Martínez, 2009), manifestándose en la pérdida continua de la capacidad cognitiva (memoria, orientación, lenguaje y atención) en personas adultas. Alrededor de 9,4 millones de personas padecen de demencia en América, siendo el Alzheimer su forma más común, y abarcando entre un 60% y 70% de los casos común (OMS, 2017)(Prince, Ali y Guerchet, 2015).

A pesar de que la etiología de la enfermedad del Alzheimer (EA) no se conoce totalmente debido a que no presenta antecedentes causales, estudios como la hipótesis colinérgica, indican que se deriva del déficit en la concentración del neurotransmisor acetilcolina (Francis, et al., 1999), responsable de parte de los síntomas de la enfermedad.

La acetilcolina(ACh) se forma en las neuronas colinérgicas encontrándose específicamente en la membrana sináptica, siendo quien controla la comunicación entre ellas, abordando el funcionamiento de la actividad normal del cerebro, tal como la atención, el aprendizaje y la memoria. La misma es destruida por las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE), causando cada una, distintos efectos clínicos en el paciente(Lima y Lucchetti, 2018).

La BuChE,se localiza en el córtex frontal e interviene en la memoria emocional, en la atención, funciones para ejecutar y en el comportamiento de la persona (Lane, Potkin y Enz, 2006: p. 101). El aumento de la actividad de BuChE incide en avances severos de la demencia, al contrario de lo que sucede en el incremento de la actividad de AChE. La enzima butirilcolinesterasa desempeña un papel funcional y de apoyo en la progresión de la EA, mientras que AChE es la enzima principal en la hidrólisis de acetilcolina.

Actualmente, los fármacos diseñados en el tratamiento específico del Alzheimer son los inhibidores de la colinesterasa en el SNC como la tacrina (actualmente no aprobado por la FDA), otros más modernos como el donepecilo, rivastigmina y la galantamina(Rang et al., 2016),que se enfocan en evitar su destrucción y en mejorar la acción colinérgica, lo que resulta en un aumento a nivel endógeno.

De los últimos fármacos mencionados, galantamina (Gal) presenta menor número de efectos adversos y su tipo de inhibición afecta tanto a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) como a la butirilcolinesterasa (BuChE). Dichas enzimas se activan simultáneamente e hidrolizan a la ACh, es decir, ambas disminuyen su concentración en las neuronas colinérgicas lo que provoca la pérdida de memoria.

La galantamina es un alcaloide extraído del bulbo de plantas de la familia *Amaryllidaceae*, las cuales sintetizan este metabolito secundario en un 90% del total de los alcaloides que se producen.

La familia de las *Amaryllidaceae*es conocida por sus alcaloides, ya que algunos exhiben interesantes características farmacológicas y propiedades biológicas (López et al., 2002) como su actividad anticáncer, antiviral, inmunoestimuladora, y antimalarial (Pagliosa et al., 2010: p. 698). A lo largo de la historia un gran número de investigaciones se han enfocado, además, en extraer sus alcaloides desde diferentes lugares del mundo.

El hallazgo más relevante fue el del alcaloide galantamina, un compuesto activo extraído del bulbo de *Galanthus woronowii*, de la familia *Amaryllidaceae*, en el año 1995 (Carretero, 2003). En todo el mundo existe un total de 70 géneros y 1600 especies de la familia *Amaryllidaceae*, únicas especies productoras que ejercen este efecto farmacológico (Acosta, 2013: p. 1)

Desde entonces, se ha extraído galantamina de otras plantas de la misma familia, para tratar la enfermedad del Alzheimer. Aunque este fármaco únicamente es efectivo durante las etapas moderadas de la EA (Cortes et al., 2014: p. 6).

Dentro de este contexto, en Ecuador hay 36 especies, 15 son endémicas (Oleas, 2011), sin embargo la planta *Phaedranassa viridiflora*, de la misma familia, no ha sido estudiada en su capacidad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, para encontrar nuevas fuentes de producción de galantamina y otros alcaloides potenciales para el tratamiento de la EA.

Por esta razón, es de vital importancia que se desarrollen proyectos de investigación en los que se fomente el estudio de la biodiversidad de especies de Ecuador, como es el caso de *Phaedranassa viridiflora*, ya que no existen estudios previos químicos, de actividad biológica ni farmacológica. Además, con esta investigación se pretende determinar el contenido del alcaloide galantamina con el fin de cubrir las necesidades actuales de este fármaco, ya que según la FDA se requieren 250 kg anuales, cifras que van en aumento cada año que pasa (Prensa, 2015).

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación de la Red CYTED 416RT0511 “Biodiversidad iberoamericana como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible” coordinado por la Universidad de Barcelona y en el que participan diversas universidades de Iberoamérica.

Además, se cumple con uno de sus objetivos “aprovechar los recursos naturales mediante la búsqueda de principios activos para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas” (CYTED, 2017). Al mismo tiempo, se obra según el artículo 14 de la Constitución del Ecuador en el que se declara que es de interés público la conservación

de los ecosistemas y la biodiversidad del país, así como la prevención del daño ambiental (Asamblea Nacional Constituyente del Ecuador, 2008: p. 26).

Objetivos de la investigación

Objetivo General:

- Determinar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora* sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

Objetivos Específicos:

- Preparar el extracto bruto alcohólico, a partir de los bulbos de la especie de *Phaedranassa viridiflora*, mediante un protocolo basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos.
- Obtener los alcaloides presentes en el extracto, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, en colaboración con la Universidad de Barcelona.
- Evaluar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa por parte del extracto alcaloidal de *Phaedranassa viridiflora* aplicando el método colorimétrico de Ellman et al. (1961), con modificaciones de Ortiz (2016), usando como referencia la galantamina.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae, pertenecientes al orden Asparagales, es un grupo de monocotiledóneas perennes y bulbosas, distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales del hemisferio sur (Lizamba Bizama, 2017: p. 12).

Las estrategias y el desarrollo de metodología para sintetizar alcaloides de la familia Amaryllidaceae han sido motivados por sus diversas e importantes propiedades farmacéuticas, incluyendo actividades anticancerígenas, antivirales, inmunoestimuladora, antimalárica e inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Pagliosa et al., 2010).

La mayoría de sus plantas poseen características similares, sus hojas son alternas, simples, mayormente lineares o acintadas, usualmente con vaina basal; poseen dos tipos de raíces, contráctiles perennes o fibrosas de vida corta; sus flores se componen en forma de embudo o tubulares, de diversos colores. En cuanto a las semillas, son numerosas, carnosas, por lo general secas, aplanadas, y aladas de color negro o marrón (Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares, 2013).

Varias de sus especies presentan adaptaciones a ambientes xéricos (secos) (León et al., 2006, p. 690). La familia Amaryllidaceae comprende un total de 70 géneros y 1600 especies distribuidas por todo el mundo (Acosta, 2013: p. 1)

En la figura 1-1 se puede observar la gran distribución de la familia Amaryllidaceae. Su hábitat se encuentra en las zonas tropicales y subtropicales, en la mitad sur de África y, en América del Sur se localizan sobre todo en la región andina. En Europa se ubican en la zona mediterránea (UNNE, 2010: p. 89).

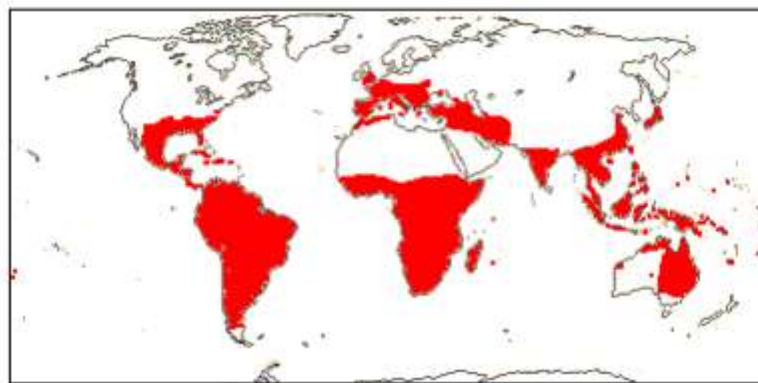


Figura 1-1 Distribución de la familia Amaryllidaceae alrededor del mundo

Fuente: (Stevens, 2001)

Cuenta con géneros de elevada importancia, como el género *Crinum* con 130 especies, el género *Hippeastrum* compuesto de 70 especies, el género *Zephyranthes* formado de 60 especies, el género *Hymenocallis* con 50 especies y por último, 50 especies que componen al género *Cyrtanthus* (Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares, 2013).

1.1.1 Familia Amaryllidaceae en Ecuador

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad por unidad de área en el mundo (Yasuní - ITT, Una iniciativa por la vida, 2010; citado en Bravo, 2014: p. 14), debido a sus altos índices de diversidad a nivel mundial.

Es altamente diverso con más de 4000 especies endémicas (Valencia et al., 2000; citado en Oleas, Meerow y Francisco-Ortega, 2013: p. 3). Existen grandes variedades de flora, fauna y demás microorganismos, dentro de un espacio determinado, así como de los procesos evolutivos a nivel de ecosistemas, genes y especies. Esto se debe a que Ecuador dispone de microclimas, idóneos para este proceso.

Destaca en la diversidad de plantas, encontrándose en el país alrededor de una décima parte de todas las especies del planeta, muchas de ellas, además, no se encuentran en ningún otro lugar del mundo, es decir, son endémicas (Mena, 2005, p. 26).

En Ecuador se han encontrado 36 especies de Amaryllidaceae, de las cuales 12 son endémicas (Meerow, 2015; citado en Jaramillo, 2019: p. 12).

1.1.2 Género *Phaedranassa*

Comprende a un pequeño género de la familia de las Amaryllidaceae (Quattrocchi, 2000; citado en Oleas, 2011: p. 15), formado por diez especies (Minga et al., 2015: p. 1), que se distribuyen entre Ecuador, Costa Rica y Colombia. Según Oleas (2011: p. 8), en su investigación “Land scape genetics of *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) in Ecuador” indicó que existen seis especies endémicas en el país, ubicadas en el norte de los Andes, uno de los puntos más biodiversos del mundo.

Las poblaciones indígenas del Ecuador, suelen reconocerles como la falsa cebolla, cebolleta o papa lobo, por el parecido entre sus bulbos, que se componen de múltiples láminas, similar a la cebolla.

Éste género se caracteriza por ser plantas geófitas bulbosas (crecen dentro de la tierra), con flores tubulares de diferentes tonalidades: rojas y rosadas o amarillas y verdes (Oleas, Meerow y Francisco-Ortega, 2013).

1.1.3 *Phaedranassa viridiflora*

1.1.3.1 Descripción



Figura 1-2 *Phaedranassa viridiflora*

Fuente: (Rare Plants, 2018)

Esta especie crece a partir de bulbos de hasta 5 cm de largo y 4 cm de diámetro, ligeramente alargados (Rare Plants, 2018). Tiene hojas pecioladas, lanceoladas estrechas de hasta 40 cm de largo. Inflorescencia pseudoumbellada, con un escapo de aproximadamente 60 cm de largo. Tiene hasta seis flores de color amarillo de forma acampanada y, es la única especie del género con esta coloración (Meerow, 1990).

Su nombre *viridiflora* proviene del latín *viridi*, que significa verde, indicando dicho color en las puntas de las flores (Oleas, 2014). Se desconoce su nombre común, aunque los habitantes de los alrededores de la reserva del Pululahua la nombran como “la papa del lobo” debido a su bulbo, que se compone de “capas”.

Phaedranassa viridiflora está categorizada como una especie en peligro según los criterios de la UICN (International Union for the Conservation of Nature) (Oleas, 2011a). Esta especie ha sido reportada en tres localidades en el Ecuador: La Reserva Geobotánica Pululahua al norte, Pelileo al centro y en los alrededores de Cuenca al sur (Oleas, 2011b).

Estas tres poblaciones forman grupos genéticos distintos (Oleas, 2011b). En la Reserva Pululahua, estudios genéticos mostraron evidencia de flujo genético entre *P. dubia* y *P. viridiflora*, formando un híbrido de color anaranjado (Oleas, Meerow y Francisco-Ortega, 2013). Estudios de biología reproductiva sugieren flujo genético entre *Phaedranassa dubia* y *Stenomessoneurantiacum* (Oleas et al., 2018). Se están realizando estudios genéticos para identificar si *P. viridiflora* amarilla, como la variedad anaranjada tienen como origen la hibridación natural entre estos géneros (Sánchez, et al., en preparación).



Figura 1-3 *P. viridiflora* de flores amarillas y posible híbrido *P. dubia* x *P. viridiflora*, de flores naranjas respectivamente

Fuente: (Oleas, 2011b, p. 93)

1.1.3.2 Taxonomía

Tabla 1-1 Taxonomía de *Phaedranassa viridiflora*

Reino	Plantae
Filo	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Asparagales</i>

Familia	<i>Amaryllidaceae</i>
Género	<i>Phaedranassa</i>
Especie	<i>viridiflora</i>

Fuente: (Tropicos.org)

1.1.3.3 Hábitat

Es considerada una especie endémica de Ecuador, ubicada en las provincias de Azuay, Tungurahua y Pichincha (véase figura 1-4). Crece y se multiplica en climas tropicales húmedos, o en valles secos. Según www.Tropicos.org la especie fue descrita en el año 1977 a 2580 m de altura. En la actualidad Red List indica que al menos cinco subpoblaciones se encuentran en la Reserva Geobotánica Pululahua (Oleas, 2015). Ésta reserva de aproximadamente 3800 hectáreas es considerada como un laboratorio natural de biodiversidad (Oleas, 2014, p. 1), ubicada dentro del cráter del volcán Pululahua, con un clima y paisajes característicos.

Según la IUCN, la especie *Phaedranassa viridiflora* está considerada en peligro de extinción (Oleas, 2015) cuyas principales amenazas son: la agricultura, el pastoreo y, el comercio como ornamentales fuera del Ecuador (se comercializa con fines decorativos debido a sus llamativas características artísticas en alguna de las partes de la planta) (Lizamba Bizama, 2017: p. 9).

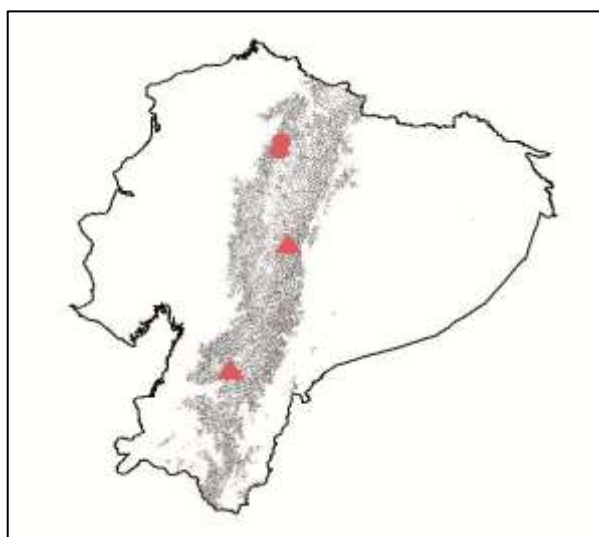


Figura 1-4 Mapa de ubicación de *Phaedranassa viridiflora*

*(de arriba hacia abajo, la provincia de Pichincha, Tungurahua y Azuay)

Fuente: (León-Yáñez et al., 2011)

1.1.4 Alkaloides en la familia Amaryllidaceae

Estos alcaloides se originan como consecuencia de una sobreproducción del aminoácido tirosina, componente substancial en la biosíntesis de estos compuestos, la cual se cree tiene lugar en los bulbos, debido a que es donde se encuentran en mayor concentración los alcaloides (Bergoñón, 1994; citado en Soto y Leiva, 2015: p. 14).

El estudio de los alcaloides en Amaryllidaceae comenzó en 1877, con el aislamiento del alcaloide licorina desde *Narcissuspseudonarcissus*. Desde entonces, se han aislados más de 500 alcaloides en esta familia (Lizama Bizama, 2017: p. 17)

Los alcaloides se pueden clasificar en nueve tipos de esqueletos, dependiendo del tipo de acoplamiento oxidativo que ocurra. Los alcaloides representativos de estos esqueletos son: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y galantamina (Bastidas y Viladomat, 2002; citado en Lizama Bizama, 2018: p. 19).

Se han encontrado una amplia gama de actividades farmacológicas de estos compuestos. Estudios demuestran que poseen actividad antiviral, antibacterial, antiparasitaria y antimalárica (Soto y Leiva, 2015: p. 18).

Las plantas de la familia Amaryllidaceae son las especie que han proporcionado la mayor cantidad de compuestos alcaloidales con actividad inhibitoria frente a AChE, enzima de gran relevancia en la etiología de la EA (Castellanos Castillo, 2014: p. 34).

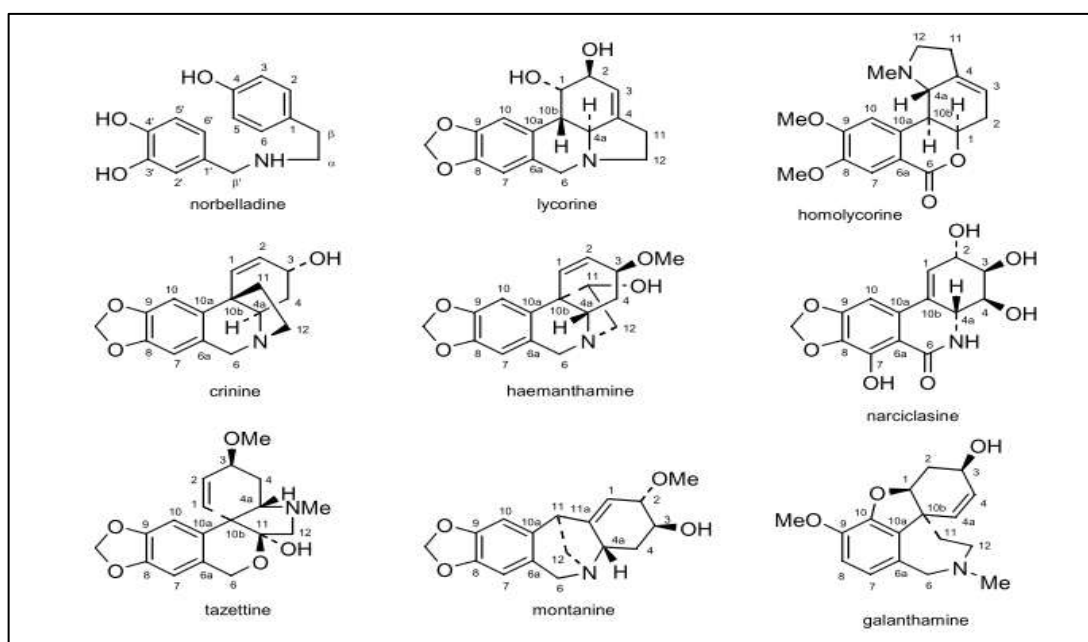


Figura 1-5 Alcaloides de la familia Amaryllidaceae

Fuente: (Bastida et al., 2011: p. 3)

Se han encontrado compuestos de origen natural que inhiben la AChE. Los más destacados de éstos son los alcaloides de la familia Amaryllidaceae: galantamina y sanguinina. El inhibidor de la AChE, el bromhidrato de galantamina (*Reminyl*) fue el primero de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae en ser aprobado como medicamento para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer. El alcaloide sanguinina se obtiene sintéticamente y de manera natural de la especie *Eucharis grandiflora* (López et al., 2002: p. 2525). Pese a que sanguinina es un inhibidor más potente, su baja abundancia natural ha impedido considerablemente su desarrollo como sustancia terapéutica (McNulty et al., 2010, p. 5290).

1.2 Enfermedad del Alzheimer

1.2.1 Descripción

Según Rang, Ritter y Flower (2016: p. 95) la causa de muchas patologías es compleja o totalmente desconocida. En los trastornos degenerativos, como la enfermedad del Alzheimer, se necesita reproducir los factores precedentes o causales, al contrario de aquellas enfermedades con manifestaciones posteriores (sintomáticas). Se caracteriza por una pérdida de las neuronas colinérgicas en el cerebro y está asociada con una disminución de los niveles de acetilcolina (ACh) (Loureiro González, 2018: p. 11).

Las neuronas que mueren en el sistema nervioso central no son sustituidas, por lo cual es un evento irreversible. Se manifiesta un inevitable deterioro de las funciones cognitivas, tales como la memoria, lenguaje, abstracción, juicio, aprendizaje, etc. (Soto y Leiva, 2015, p. 282), que impide el desarrollo de actividades diarias, sociales y culturales, entre otras. Es una enfermedad que acarrea problemas tanto a nivel mundial como a nivel nacional. Las cifras de prevalencia del Alzheimer se va a cuadruplicar en el 2050 (Ortiz et al., 2012: p. 2). Como indica Rang (2016: p. 487), su prevalencia aumenta con la edad, desde alrededor del 5% a los 65 años al 90% o más a los 95 años.

1.2.1.1 Etapas de la enfermedad

La enfermedad del Alzheimer tiene tres etapas principales:

- Etapa preclínica: inicia la acumulación de las proteínas A β y tau, sin que aparezcan los síntomas.

- Etapa de deterioro cognitivo leve: episodios de pérdida de memoria como preguntas repetidas, elementos extraviados, falta de atención, etc. Episodios que no son tan graves como para afectar la función diaria.
- Última etapa: demencia con pérdida progresiva de habilidades funcionales (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019: p. 351).

1.2.1.2 Clasificación de acuerdo a la edad

De acuerdo a la edad de inicio existen 2 formas clínicas fundamentales:

- Forma presenil o temprana: en menores de 65 años con agregación familiar, ocupan del 5 al 10% de todos los casos.
- Senil o tardía: en mayores de 65 años de edad, de patrón esporádico, ocupan el 90 – 95% de los casos (Pérez, 2009).

1.2.2 Descubrimiento de la enfermedad

A inicios del siglo XX, en 1907, el neurólogo alemán Alois Alzheimer, diagnosticó por primera vez la Enfermedad del Alzheimer, luego del estudio del cerebro de Augusta D. de 51 años (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar, 2003). Mientras, trabajaba en una clínica de enfermos mentales en la ciudad de Frankfurt.

En su cerebro encontró, lo que hoy en día, caracteriza a la enfermedad en cuanto a histología: atrofia, reducción de los ovillos neurofibrilares y placas de amiloide. Además de la clínica que presentaba la paciente, como los fallos de memoria y cambios en su conducta (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar, 2003).

En un principio era una curiosidad científica, pero tras aumentar el número de casos y con el paso de los años, la EA se ha convertido en una patología de gran impacto en el estado de salud, que no afecta solamente al paciente, sino a la familia, además de representar un costo económico para su tratamiento (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar, 2003).

De este modo, se documentó el primer caso clínico de este padecimiento, distinguiéndolo de la conocida demencia senil, enfermedad que requiere un tratamiento diferente. Hoy en día la EA es un foco de alarma y de primordial atención para su investigación en la comunidad médica mundial (Snell, 2010, p. 462).

1.2.3 Etiología de la enfermedad del Alzheimer

1.2.3.1 Introducción

1.2.3.2 Neurotransmisión colinérgica

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que permite la comunicación entre neuronas. La neurotransmisión colinérgica es el resultado de la unión de ACh, liberada por las terminales nerviosas presinápticas, a los receptores de acetilcolina (Snell, 2010 : p. 110). Los receptores se dividen en dos grandes clases, cada uno conformado de subtipos: receptor nicotínico ($\alpha 1$ - $\alpha 10$) y receptor muscarínico (M1-M5) (Castellanos Castillo, 2014: p. 23).

La ACh se sintetiza y almacena, en las terminaciones nerviosas de las neuronas, a partir de colina mediante la acción de la colina acetiltransferasa. En las terminaciones nerviosas presinápticas se encuentran las enzimas colinesterasas que hidrolizan a la acetilcolina, y ésta se resintetiza continuamente (Rang, Ritter y Flower, 2016: p. 176). De manera general, la ACh se libera de la neurona presináptica, difunde por la hendidura sináptica hacia los receptores específicos de la neurona postsináptica pero no llega en su totalidad, ya que una parte se queda en la hendidura a causa de la acción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (figura 1-6).

Según Rang (2016: p. 491), la acetilcolina se encuentra distribuida por todo el sistema nervioso y se encuentra en el encéfalo, prosencéfalo (incluida la corteza), el mesencéfalo y el tronco del encéfalo. Al encontrar una marcada disminución de acetilcolina en el cerebro, investigadores iniciaron la hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar, 2003: p. 2), que conllevaba a una falla en la comunicación colinérgica. Éstas zonas cerebrales tienen altas concentraciones de receptores muscarínicos (M_2), de gran relevancia en la EA, a los que se le une el neurotransmisor ACh para producir la respuesta de la célula postsináptica (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019: p. 167). La acción de la ACh termina con el metabolismo extracelular de las enzimas acetilcolinesterasa o butirilcolinesterasa (BuChE) a colina y acetato.

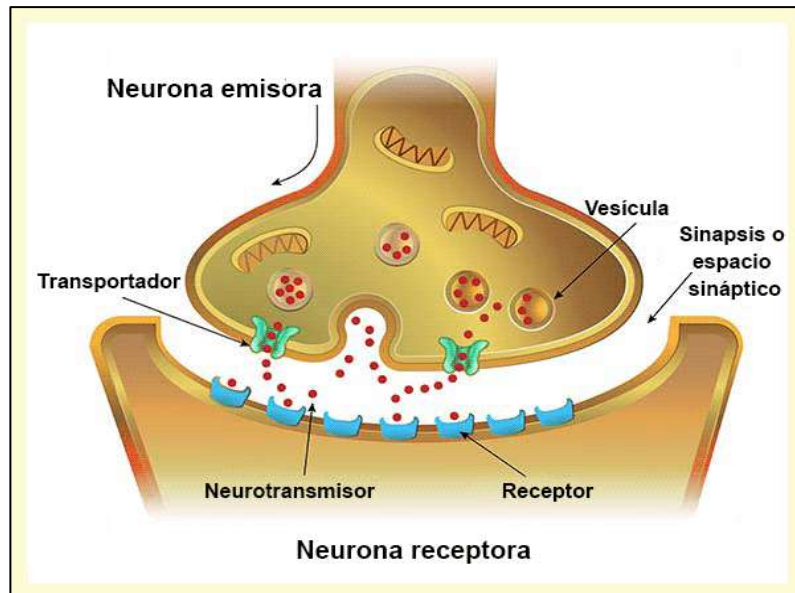


Figura 1-6 Diagrama sistemático de una sinapsis colinérgica generalizada

Fuente: (Rang et al., 2016: p. 176)

El transporte de precursores y el metabolismo de ACh son esencialmente los mismos en las uniones de los receptores nicotínicos y muscarínicos (Kleinz y Spence, 2008: p. 7).

1.2.3.3 Enzimas colinesterasas

Como se sabe, las colinesterasas se encuentran en zonas como la sangre, el hígado, el intestino, la unión neuromuscular y en el cerebro, pero en el caso de las demencias como la EA, interesa su acción en las áreas cerebrales (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar, 2003: p. 6).

Lane (2006: p. 102) indica que la función que realiza AChE es altamente selectiva para la hidrólisis de acetilcolina. La acetilcolinesterasa es una enzima muy eficiente, cada molécula puede hidrolizar 6×10^5 moléculas de acetilcolina/minuto (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019: p. 182).

En cambio, BuChE puede metabolizar diferentes moléculas, incluso ciertos péptidos neuro activos. La enzima butirilcolinesterasa no se encuentra en las sinapsis nerviosas, sino en el hígado y en el plasma (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019: p. 180). El papel fisiológico de esta enzima no ha sido aún determinado completamente, aunque se conoce que es probable que participe en la hidrólisis de la acetilcolina en la unión neuromuscular, así como de ejercer roles

en la atención, función ejecutiva, memoria emocional y comportamiento (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019: p. 163).

1.2.3.4 Plegamiento anómalo y agregación de proteínas

Por plegamiento se entiende a la forma anormal que adoptan las proteínas formando primeramente oligómeros solubles y después agregados insolubles de gran tamaño, causando daños dentro de la célula ya que tienden a pegarse en las membranas celulares y a la agregación, lo que provoca la muerte de la neurona (Rang, Ritter y Flower, 2016: p. 499).

Estas formas mal plegadas, se van creando y acumulando a lo largo de los años. En el sistema nervioso estos agregados de la proteína β -amiloide ($A\beta$) adoptan el nombre de depósitos amiloides, caracterizando a las enfermedades neurodegenerativas (Rang, Ritter y Flower, 2016: p. 499). La aparición precoz de los depósitos de amiloide presagia el desarrollo de la EA (Rang, Ritter y Flower, 2016: p. 488). En cambio, cuando el plegamiento se produce por la proteína tau, la anatomía patológica que ocasiona, se llaman ovillos neurofibrilares. Aunque poco conocida, también se le denomina como la hipótesis de la proteína tau. Consiste en la fosforilación de dicha proteína, impidiendo que se una a la tubulina, y después auto-agregándose (Loureiro González, 2018: p. 14).

No obstante, existen proteínas guías que indican a las otras proteínas como plegarse de forma correcta (proteínas chaperonas) y, en condiciones normales, las proteínas mal plegadas pueden ser eliminadas a través de mecanismos de degradación, procesos que no ocurren en los pacientes con EA.

Hipótesis amiloide

Existen tres tipos de genes en los que se producen mutaciones, a los que se le han identificado como causas posibles de la aparición temprana de EA autosómica dominante: los genes APP, PSEN1 y PSEN2. El gen APP codifica la proteína precursora β -amiloide ($A\beta$), los dos siguientes genes codifican preselina 1 y preselina2, respectivamente (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019: p. 350). El factor genético junto el plegamiento de las placas amiloides y su posterior toxicidad en las neuronas, forman una de las posibles causas de la EA.

Además de los factores genéticos que aumentan la incidencia de la enfermedad, existen otro tipo de factores como: género, y edad, tóxico ambientales, nutricionales, culturales, socioeconómicos, cognitivos y epifenómenos (deterioro cognitivo leve) (Loureiro González, 2018: p. 15).

Hipótesis colinérgica

Esta teoría está reforzada por el importante papel que la ACh desempeña en el aprendizaje y memoria. Establece que el deterioro de la comunicación neuronal contribuye significativamente al deterioro de las funciones cognitivas y a una neurodegeneración (Carretero, 2003: p. 140). Uno de los principales mecanismos para mejorar la función colinérgica se basa en la inhibición de la actividad de las enzimas colinesterasas (AChE y BuChE).

Según Elufioye (2018: p. 3), se ha observado que BuChE aumenta en el cerebro de los pacientes con EA. Es por ello, que se ha sugerido que la inhibición de ambas enzimas puede ser importante en el manejo de déficits cognitivos.

1.2.4 Sintomatología

Los pacientes con EA tienen una variada sintomatología, y ésta no es la misma en todos ellos; en unos la enfermedad aparece progresivamente de forma lenta, con una serie de signos relacionados; en cambio en otros es de rápida evolución y de severos síntomas motores que se da en sujetos más jóvenes (Perez, Serrano, 2005). Se conoce que tiene una incidencia mayor en mujeres (7,13%) que en hombres (3,31%) y mostrando, asimismo, una tendencia creciente en grupos de mayor edad (Loureiro González, 2018: p. 12).

1.2.5 Diagnóstico

Aproximadamente a partir de los 3 años del inicio de los síntomas, se diagnostica la EA. Se usa la resonancia magnética, tomografía cerebral y exploraciones PET (tomografía por emisión de positrones) de amiloide.

En el estudio microscópico, los cambios afectan finalmente a toda la corteza cerebral, pero comienzan afectando selectivamente a algunas regiones del encéfalo (Snell, 2010: p. 464). Se encuentra una atrofia general del cerebro, la gran cantidad de placas amiloides y ovillos neurofibrilares en el área del hipocampo, y en el centro de cada placa senil, se encuentra una colección extracelular de tejido nervioso en degeneración (Snell, 2010: p. 464).

En la figura 1-7 se observa el cerebro de un paciente con EA con un estrechamiento en las circunvoluciones y un ensanchamiento en los surcos, apreciado generalmente en este tipo de demencia.

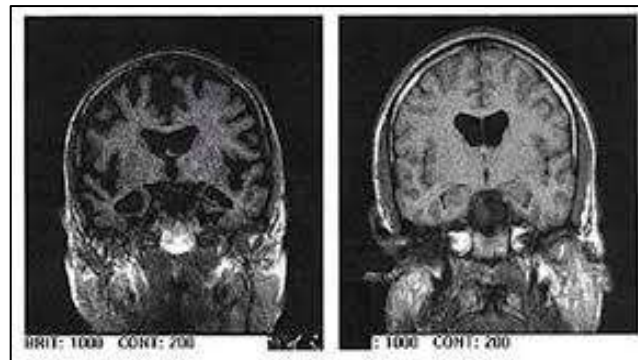


Figura 1-7 Comparación de TAC

*TAC de atrofia cerebral en paciente con EA (izquierda) y paciente sano (derecha).

Fuente: (Loureiro González, 2018: p. 13)

Según Brunton (2019: p. 351), en los últimos años se ha incursionado en el uso de biomarcadores en los criterios de diagnóstico, biomarcadores de fluidos como cambios en las proteínas A β y tau en el líquido cefalorraquídeo.

Aunque no exista una prueba exacta que permita el diagnóstico de la EA, la clínica del paciente, acompañada de los exámenes neurológicos y psicológicos permiten evaluar la enfermedad, excluyéndola de otros tipos de demencia en adultos mayores.

1.2.6 Tratamiento farmacoterapéutico

En un inicio el desarrollo de un tratamiento farmacoterapéutico era poco prometedor. Aunque en la actualidad los medicamentos desarrollados no ofrecen una cura, por la incidencia, la

repercusión social y familiar en una población cada vez más envejecida, han fomentado al desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos (Rang, Ritter y Flower, 2016: p. 499).

Esta patología crónica, degenerativa y letal, no ha encontrado la posibilidad de curación total, los síntomas tienden a empeorar hasta provocar la muerte de la persona comúnmente a los 10-15 años desde el diagnóstico en una fase inicial (Loureiro González, 2018: p. 13).

Las drogas que inhiben la AChE se llaman antiChE, ya que tienen acción inhibitoria tanto en AChE, como en BuChE (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019: p. 59). En la actualidad existen cuatro inhibidores reversibles de la ACh autorizados para el tratamiento de la EA ligera o moderada: el donepezilo, galantamina y rivastigmina. (Clark et al., 2012: p. 138). Estos medicamentos son los únicos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) y por la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, por sus siglas en inglés)

Los inhibidores de colinesterasa, tienen la afinidad e hidrofobicidad necesarias para cruzar la barrera hematoencefálica y exhiben una acción de duración prolongada. Estudios indican que desaceleran la disminución de la función cognitiva y la manifestación del comportamiento durante intervalos de tiempos específicos (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019: p. 191). Como máximo, estos compuestos reducen ligeramente el ritmo de la pérdida de la función cognitiva. El médico indicará que la manera de empezar el tratamiento farmacológico debe ser paulatinamente, con el fin de evitar efectos colaterales, e ir incrementando las dosis.

En la siguiente figura se encuentran las estructuras de los fármacos inhibidores de colinesterasa.

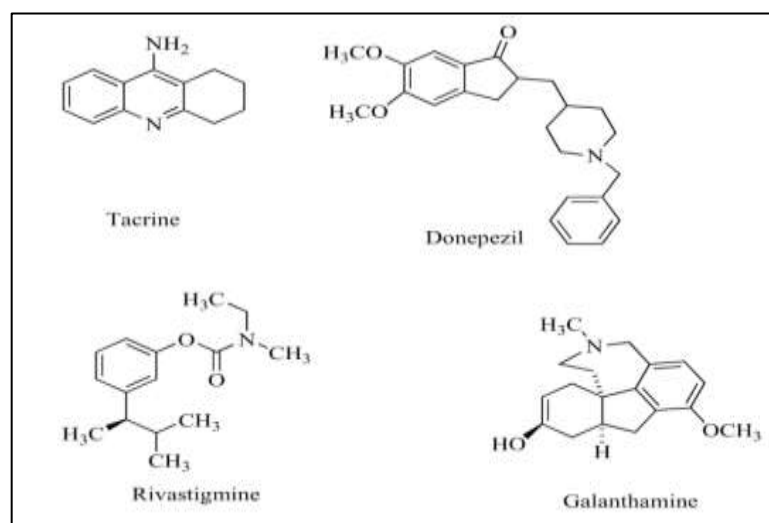


Figura 1-8 Fármacos inhibidores de la colinesterasa usados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Fuente: (Yar et al., 2015, p. 3)

La butirilcolinesterasa es más abundante en las áreas afectadas inicialmente en la demencia, como la límbica, por lo cual los medicamentos que tienen doble acción inhibitoria, es decir, frente a BuChE y AChE, son muy útiles en el manejo del trastorno de comportamiento de estos pacientes (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar: 2003: p. 5).

Se ha encontrado evidencia sobre los fármacos de acción dual, ya que al ejercer su acción sobre BuChE, afecta la formación y la maduración de amiloide y hace que éste sea menor o, que las placas inertes no se transformen en dañinas (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar, 2003: p. 5)

1.2.6.1 Inhibidores de Colinesterasas

Galantamina

Metabolito secundario, exclusivo de la familia de las *Amaryllidaceae*. Es un alcaloide terciario, quirál que se puede extraer tanto de los bulbos como de las flores de las especies *Narcissus*, y de la campanilla caucásica del *Galanthus woronowii*(Valencia, 2015: p. 21).

Mientras que varias síntesis totales del alcaloide están disponibles, la comercialización actual se realiza principalmente por la extracción limitada de poblaciones naturales de *Leucojum aestivum* de Turquía (con bajo contenido de principio activo) o Bulgaria, que no son suficientes para cumplir con la demanda farmacéutica actual(Ortiz et al., 2016: p. 2).

Actúa con dos mecanismos distintos: como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y como potenciador en la unión a los receptores nicotínicos.

La enzima AChE posee un sitio de acción que incluye un grupo hidroxilo formando un intermedio tetraédrico entre la enzima y el sustrato, que mediante la hidrólisis del neurotransmisor se libera acetato y colina (Mosquera M et al., 2004: p. 155).

Actúa como modulador alostérico, es decir, se une al receptor nicotínico de la neurona postsinápticas por el sitio alostérico, haciendo que la ACh sea más a fin a dicho receptor (Carretero, 2003, p. 142). En comparación con los otros, la galantamina es competitiva, los demás son inhibidores no competitivos de la acetilcolina en el SNC (Clark et al., 2012: p. 138).

Se une reversiblemente al lugar activo de la acetilcolinesterasa (AChE), lo que hace que tenga menores efectos adversos en comparación con los otros fármacos. Presenta una selectividad 53 veces mayor que la butirilcolinesterasa (BuChE).

Rivastigmina y donepezilo

La rivastigmina es un fármaco selectivo para el SNC, aunque se debe proceder a un aumento gradual de la dosis para reducir los efectos adversos (Rang, Ritter y Flower, 2016: p. 507). Tiene un efecto de mayor duración y está disponible en formulaciones orales y parches epidérmicos (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019: p. 192). Puede cruzar la barrera hematoencefálica fácilmente y posee propiedades inhibitorias de la AChE y BuChE (Valencia, 2015: p. 20).

En cambio, el donepezilo fue aprobado en 1996 para el tratamiento de leve a moderado de la EA. Fue diseñado como un inhibidor selectivo para AChE y no presenta grandes efectos adversos (Valencia, 2015: p. 19).

Tacrina

Fue el primer fármaco descubierto como inhibidor de las colinesterasas (Rang, Ritter y Flower, 2016: p. 507), llamado también tetrahidroaminocridina. No estuvo demasiado tiempo en el mercado por su efecto de hepatotoxicidad (Clark et al., 2012, p. 139) y, por el hecho de que debe tomarse cuatro veces al día, lo hacían totalmente impráctico (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar, 2003, p. 4). Su acción inhibitoria afecta a las dos enzimas colinesterasas, BuChE y AChE, aunque no es selectiva para el SNC.

Los efectos adversos comunes en todos estos fármacos consisten en náuseas, diarrea, vómitos, anorexia, temblores, bradicardia y calambres musculares (Brunton, Hilal-Dandan y Knollmann, 2019, p. 173).

1.2.6.2 Antagonismo del receptor N-metil-D-aspartato (receptor NMDA)

Memantina

Fármaco que actúa como antagonista del receptor NMDA, de modo no competitivo para interferir en la disfunción glutamatérgica. Su mecanismo de acción consiste en unirse al estado abierto del canal del receptor NMDA, el cual permite la entrada de Ca^{2+} para la neurotransmisión. En los pacientes con EA, el receptor causa una apertura prolongada del canal, produciéndose una entrada excesiva del Ca^{2+} , una excitotoxicidad y muerte celular (Hohlfeld y Endres, 2018: p. 126). En el año 2003, la FDA aprobó la memantina.

1.3 Método espectrofotométrico de Ellman

Para la identificación de compuestos con actividad inhibitoria de AChE se ha utilizado el método espectrofotométrico de Ellman con algunas modificaciones (Ortiz et al., 2016), una determinación colorimétrica sencilla y rápida. La actividad enzimática se mide siguiendo la intensidad del color amarillo producido por la tiocolina cuando reacciona mediante hidrólisis, gracias a la acción de la enzima colinesterasa AChE, generando acetato y ioduro de tiocolina, incorporándose el ácido ditionitrobenzoico (DTNB) (Ellman et al., 1961) (Mosquera M et al., 2004: p. 3). Al mismo tiempo que se forma el anión 5-tio-2-nitro-benzoato, el que le da el color amarillo, y la 5-tio-2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina (figura 1-9).

Este método es extremadamente sensible y es aplicable a pequeñas cantidades de muestra o a bajas concentraciones de enzima. Se usa la acetilcolina como sustrato. Existe otra variante de la técnica existente, que consiste en utilizar como sustrato a la butirilcolina, produciéndose la misma reacción con reactivo de Ellman, DTNB. La intensidad del color amarillo es medida en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 405 nm (Ortiz et al., 2018).

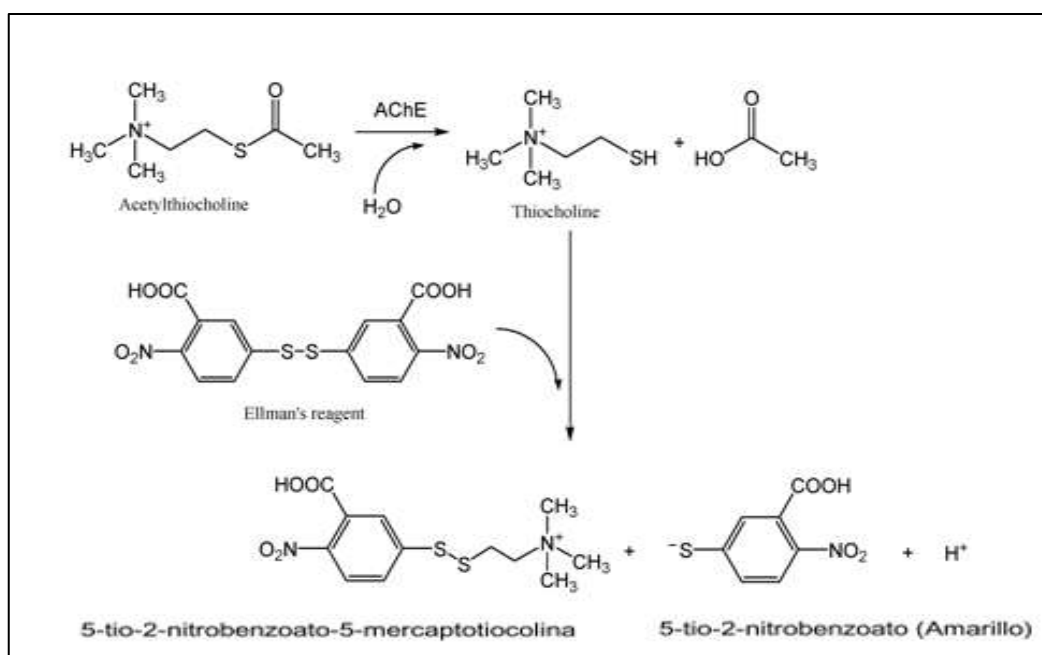


Figura 1-9 Sucesión de reacciones que conforman el método de Ellman para la determinación de la actividad de AChE

Fuente: (Ellman et al., 1961)

1.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Se ha demostrado que el análisis GC-EM es una herramienta útil en la identificación de estructuras nuevas, conocidas o inusuales a partir de extractos ricos en alcaloides al comparar sus patrones de fragmentación en masa con la referencia estándar (Ortiz et al., 2016: p. 1).

Cromatografía de gases

En el año 1952 se describe por primera vez la técnica de cromatografía de gases (CG), usado en la actualidad como método para la separación de los componentes de una muestra que son volátiles y aquellos que son medianamente volátiles, mientras alcancen una estabilidad química a una temperatura menos de los 400°C. Sus ventajosas características como: un tiempo de análisis corto, la sensibilidad y la combinación de altas resoluciones hacen que sea un método usado en los laboratorios de manera común (Gutiérrez y Droguet, 2002: p. 1).

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (EM) es una de las técnicas más completas que existen. Aporta datos cuantitativos, su elevada sensibilidad hacen que su capacidad de identificación sea inequívoca, además aporta información de la molécula de manera estructural, de manera rápida y específica (Gutiérrez y Droguet, 2002: p. 3). La información del espectro de masas representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

Como solución al problema de identificar los diversos componentes de una mezcla, ha adquirido gran importancia el acoplamiento entre un equipo cromatográfico y una técnica de carácter cualitativo capaz de identificar los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica (Museo Nacional de Ciencias Naturales, [sin fecha]: p. 27). Los análisis químicos, que se basan en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), han de ser realizados por laboratorios autorizados (Rang et al., 2016: p. 721). Además de su bajo costo, rapidez y alta resolución, brinda también la posibilidad de diferenciar isómeros (Acosta, 2013: p. 10).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Población de estudios

Se estudió la variedad amarilla de la especie de *Phaedranassa viridiflora* y, la variedad naranja de *Phaedranassa viridiflora*, presentes en la:

Reserva Geobotánica Pululahua, provincia de Pichincha, Ecuador.

2.2 Tamaño de la muestra

Para la identificación de los alcaloides y la determinación de su actividad inhibitoria, se usaron bulbos. Se recolectaron los 2 bulbos frescos de la especie *Phaedranassa viridiflora* de flor amarilla y 2 bulbos frescos de la especie *Phaedranassa viridiflora* de flor naranja, encontrándose ambas en estado de floración.

Se sometieron a secado, obteniendo un peso final de 37g de muestra seca de la primera especie y 32g de la segunda especie, aproximadamente.

2.3 Lugar de recolección del material vegetal

El lugar de recolección de *Phaedranassa viridiflora* fue en la Reserva Geobotánica del Pululahua, a 17 km de Quito provincia de Pichincha, la cual está conformada por 3383 hectáreas. La recolección e investigación de la especie se realizó legalmente con autorización del Ministerio del Ambiente del Ecuador ya que cuenta con el Contrato marco de acceso a los recursos genéticos del proyecto de investigación científica denominado: “La biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible” con código MAE-DNB-CM-2015-0054.

El permiso de movilización fue autorizado por el Ministerio del Ambiente del Ecuador, para transportar la especie desde la Reserva Geobotánica Pululahua, en la provincia de Pichincha, hasta el laboratorio de Productos Naturales, en la provincia de Chimborazo, con código ().

2.4 Lugar de investigación

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Productos Naturales perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, donde se realizó la extracción de alcaloides y los ensayos de inhibición de colinesterasas.

En cuanto a la obtención de los resultados de la CG-EM para la identificación del perfil alcaloideo de las muestras se colaboró con la Universidad de Barcelona (España).

2.5 Materiales, reactivos y equipos

2.5.1 Materiales

Tabla 2-1 Materiales empleados

PROCEDIMIENTO		MATERIAL	CANTIDAD
I.	Preparación de reactivos	Pipeta graduada 5 ml	2
		Pipeta graduada 10 ml	2
		Probeta de 100 ml	1
		Vaso de 1000 ml	2
		Vaso de 250 ml	3
		Frasco ámbar 500 ml	2
		Pera de succión	1
		Pesa muestra	2
		Varilla agitación	2
II.	Extracción de alcaloides	Embudo de separación	2
		Balón esmerilado 250 ml	2
		Balón esmerilado 500 ml	2
		Vaso precipitación 250 ml	3
		Vaso de precipitación 600 ml	3
		Pipetas Pasteur	2
		Goteros	2
		Vial de vidrio	2
		Desecador	1
		Frasco ámbar 1000 ml	2
III.	Ensayo de determinación	Tubos con base de tapa rosca azul 20 ml	4
		Tubo con base de tapa rosca gris 14 ml	2

	inhibitoria de colinesterasas	Microplaca de 96 pocillos	2
		Placa de hielo reutilizables	6
		Tubo Eppendorf 0,5 ml	300
		Tubo Eppendorf 1,5 ml	200
		Punta amarilla de micropipeta	3500
		Punta azul de micropipeta	1000
		Placa de plástico para pipeta multicanal	5
		Placa de poliestireno	2
IV. Uso generalizado		Papel aluminio (rollo)	1
		Toallas absorbentes (rollo)	2
		Toallas de papel ligeras (caja)	2
		Bolsas herméticas	4

Realizado por: Cinthia Erazo

2.5.2 Equipos

Tabla 2-2 Equipos utilizados durante la investigación

PROCEDIMIENTO	EQUIPO
Tratamiento muestra vegetal	Estufa de secado Red Line
	Molino Arthur. H. Thomas C. O
	Sonicador
Pesaje de reactivos sólidos. Pesaje material vegetal.	Balanza analítica HDM
Extracción de alcaloides	Rotavapor
	Sonicador
	pH-metro
Conservación muestra. Conservación reactivos.	Refrigerador
	Congelador
Ensayo de determinación inhibitoria de colinesterasas	Espectrofotómetro ELISA
	Centrifuga
	Agitador vórtex
	Cronómetro

Identificación de alcaloides	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas
-------------------------------------	---

Realizado por: Cinthia Erazo

2.5.3 Reactivos

Tabla 2-3 Reactivos utilizados

PROCEDIMIENTO	REACTIVO
Preparación material vegetal	Metanol CH ₃ OH
Preparación de reactivos	Agua destilada
	Agua bidestilada
Extracción de alcaloides	*Acetato de etilo C ₄ H ₈ O ₂
	*Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂
	Hidróxido de amonio NH ₄ OH(25% V/V)
	Ácido clorhídrico HCl (0.5 N)
	Hidróxido de sodio NaOH (0.5 N)
	Sulfato de sodio anhidro Na ₂ SO ₄
	Goma arábica
	Fosfato dipotásico K ₂ HPO ₄
	Bifosfato de sodio NaH ₂ PO ₄
	Fosfato dipotásico Na ₂ HPO ₄
	Cloruro de sodio NaCl
	Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i>
	Butirilcolinesterasa de suero equino
	Acido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico
	Yoduro de acetilcolina
	Yoduro de butirilcolina
	Galantamina

Realizado por: Cinthia Erazo

Nota: (*) Los solventes de grado reactivo fueron adquiridos de casas comerciales nacionales con un permiso ocasional.

2.6 Preparación de la muestra

Se seleccionaron únicamente bulbos en buenas condiciones, es decir, sin cortes o daños aparentes a simple vista y fueron lavados con agua destilada, para evitar contaminaciones.

Luego de su limpieza, se desprendió cada capa superpuesta del bulbo, que se cortaron en finas láminas de 3cm aproximadamente, mismas que fueron secadas a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron en la estufa de secado a 40 °C durante tres días y se almacenaron hasta su posterior molienda en el molino de cuchillas obteniendo un triturado homogéneo.

2.7 Identificación botánica

La identificación botánica se realizó en la ciudad de Quito, por parte de la investigadora Dra. Nora Oleas, responsable del Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica.

2.8 Extracción de alcaloides

La extracción se realizó por maceración de la especie vegetal molida usando el solvente metanol. Se coloca la droga vegetal en un frasco ámbar de 1000 mL de capacidad, con 800 ml de disolvente, por un periodo de tiempo de 72 horas a temperatura ambiente. Se emplearon periodos de sonicación de una hora al día para mejorar la maceración. Transcurrido este tiempo, se filtraron los macerados, obteniéndose el extracto bruto. Después se procedió a evaporar el solvente del usando el rotavapor a presión reducida a 50° C, obteniéndose por un lado el extracto crudo seco y por otro el solvente recuperado.

Dicho extracto se colocó en un embudo de separación con ácido sulfúrico (2% V/V), donde los alcaloides se solubilizaron en forma de sales, mientras que otras sustancias que formaban parte del extracto se quedaron en la fase orgánica, como los pigmentos más lipófilos. Seguidamente se añadió éter etílico, para obtener dos fases claramente visibles en el embudo de separación, la fase orgánica que es desechada y una fase acuosa acida con la que se sigue trabajando. Se realizaron cuatro repeticiones para desengrasar más exhaustivamente.

Seguidamente el extracto fue basificado con hidróxido de amonio (25% V/V) hasta que el pH se ajustó a 10 y, se agregó acetato de etilo, para conseguir que los alcaloides disueltos quedasen retenidos en la fase orgánica, obteniéndose así una fase acuosa alcalina, la cual no se empleó, y

la fase orgánica donde se encontraban los alcaloides. A ésta, después se añadió sulfato de sodio anhidro y goma arábiga para eliminar residuos de agua y se filtró.

El extracto alcaloidal fue concentrado eliminando el solvente mediante el uso de rotavapor hasta la obtención del extracto de alcaloides que se trasvasa a un frasco tipo vial.

2.9 Análisis de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

A partir del extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora* se realizó el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El equipo que se usó fue el Cromatógrafo de Gases Agilent, modelo 6890, acoplado al Espectrómetro de Masas modelo 5975, el mismo trabaja a 70 Ev a 230 °C en la fuente iónica.

El Cromatógrafo de Gases en el que se realizaron los análisis fue SAPIENS-XS-MS (30 x 0.25mm x 0,25 µm), teniendo como fase estacionaria la fenilmetilsilicona al 5%.

La fluctuación de temperatura se realizó de la siguiente manera (Acosta et al., 2014: p. 2)

- Incremento inicial desde 55 °C hasta 100 °C (60 °C/min)
- Dos minutos a 100°C
- Incremento desde 100°C hasta 180°C (15°C/min)
- Un minuto a 180°C
- Incremento desde 180°C hasta 300°C (5°C/min)

El inyector del equipo trabajó a una temperatura de 280 °C con un flujo de helio de 0.8 ml/min y se usó el método *splitless*. El alcaloide galantamina se empleó como referencia en cada ensayo y para el análisis de datos se empleó el software llamado AMDIS 2.71 (NIST). La identificación de alcaloides se llevó a cabo en comparación con otros componentes (Acosta et al., 2014, p. 2), considerando la fragmentación de patrones e índices de retención (IR).

2.10 Preparaciones para el ensayo de microplaca para la actividad inhibitoria de AChE y BuChE

2.10.1 Preparación de soluciones

- **Buffer fosfato salino (PBS)**

Para la preparación de 1L de PBS se requirió de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 8Mm, bifosfato de sodio (NaH_2PO_4) 2.3 Mm, cloruro de sodio (NaCl) 0,15 M que fueron disueltos con agua bidestilada, añadiendo hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N hasta alcanzar un pH=7.5.

- **Solución salina**

Para la preparación de 1L de solución salina se necesitó de Na_2HPO_4 que fue disuelto en agua destilada.

- **Ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzoico) DTNB**

Cada tubo eppendorf (1 mL) de DTNB empleado tenía una concentración de 2mg/1mL. Se conservó en congelación a -20°C.

2.10.2 Preparación de sustrato

- **Yoduro de acetilcolina (ATC)**

Se preparó a una concentración de 1,7mg/200μL

- **Yoduro de butirilcolina (BTC)**

Se preparó a una concentración de 1,9mg/200μL.

2.10.3 Acondicionamiento de enzimas

- **Acetilcolinesterasa (AChE)**

Se preparó a una concentración final de 0,195 U/mL.

- **Butirilcolinesterasa (BuChE)**

Se preparó a una concentración final de 6,25 U/mL.

2.10.4 Compuesto de referencia galantamina

Para elaborar las diluciones de galantamina, se empleó un comprimido recubierto de 8 mg, marca Numencial®, triturado y disuelto en PBS.

Se realizaron diluciones como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2-4 Diluciones y concentraciones de galantamina empleadas en los ensayos de inhibición de AChE y BuChE

ACETILCOLINESTERASA		BUTIRILCOLINESTERASA	
Numero de dilución	Concentración	Numero de dilución	Concentración
2	1×10^{-4} M	1	1×10^{-3} M
3	1×10^{-5} M	2	1×10^{-4} M
4	$0,5 \times 10^{-5}$ M	3	1×10^{-5} M
5	1×10^{-6} M	4	$0,5 \times 10^{-5}$ M
6	$0,5 \times 10^{-6}$ M	5	1×10^{-6} M
7	1×10^{-7} M	6	$0,5 \times 10^{-6}$ M

Realizado por: Cinthia Erazo

2.10.5 Diluciones del extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora*

El extracto alcaloidal de *P. viridiflora* de variedad amarilla y naranja, se prepararon en dos tipos de disoluciones. Los extractos fueron inicialmente disueltos en metanol, y después, a dicha disolución, se le añadió DMSO con la finalidad de mejorar los efectos de solubilidad de los metabolitos secundarios.

En general los alcaloides son solubles en solventes orgánicos como es el caso del DMSO. Se usaron concentraciones de trabajo asegurando que la concentración de DMSO no excediera el 0,1% (V/V) como en la investigación de Pellegrino et al. (2018, p:15).

La forma en la que se procedió fue la siguiente:

- Se prepara el DMSO al 0,1% (V/V). Para ello se disuelve 10 µL de DMSO y 9990 µL de PBS.
- Se prepara la solución madre, con 100 µL de metanol (10%), 10 mg extracto y 900 µL del DMSO 0,1% (V/V).

Para la determinación de la actividad de inhibición enzimática de AChE y BuChE, cada extracto de alcaloides, según el solvente usado, se emplearon concentraciones distintas. Se modificaban acorde a los resultados obtenidos de la medición de absorbancia.

Por lo que se llevó a cabo una doble comparación de resultados: según el tipo de disolución, y según la enzima sobre la que se actúa.

2.11 Inhibición *in vitro* de acetil- y butirilcolinesterasa

El ensayo se llevó a cabo en microplaca de acuerdo al método de Ellman y col., 1961 modificado (Ortiz y col., 2016). Se adicionó 50 μ L de AChE o BuChE disueltas en buffer (8 mM K₂HPO₄, 2.3 mM NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.6) y 50 μ L de la muestra disuelta en el mismo buffer. Se incubó la placa a 24 °C durante 30 min y se agregó 100 μ L de solución sustrato (acetiltiocolina o butiriltiocolina, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.5 M DTNB, and 0.6 mM ATCI in Millipore water, pH 7.5). Luego de 5 min, la absorbancia fue leída en un lector de micro placas Thermo Scientific Multiskan FC a 405 nm. La actividad inhibitoria enzimática fue expresada como la concentración a la cual se inhibe el 50% de la actividad enzimática (IC₅₀), se compararon los datos de lectura de las muestras con la lectura de la enzima en buffer sin inhibidor. Los datos de inhibición enzimática fueron analizados con el software Microsoft Excel o Prism (Graph Pad Inc., San Diego, CA, USA). Las concentraciones de las muestras evaluadas se expresaron como μ g/mL para los extractos y como μ M en el caso de compuestos puros. Los valores calculados de IC₅₀ cuyo valor se encontró por encima de 200 μ g/mL para extractos y por encima de 200 μ M para compuestos puros, se consideraron inactivos. Las muestras se evaluaron por triplicado, en tres ensayos independientes y se calculó la desviación estándar

Las enzimas utilizadas fueron AChE de la anguila eléctrica *Electrophorus electricus*, C3389 y BuChE de suero equino (C7512), mientras que los sustratos utilizados en cada caso fueron ioduro de acetiltiocolina (A5751) y ioduro de butiriltiocolina (20820). Para generar la reacción de color se utilizó ácido ditionitrobenzoico (DTNB, D-8130) todos adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich.

2.12 Análisis de datos

Luego de obtener las absorbancias registradas en el software del espectrofotómetro de microplaca Thermo Scientific Multiskan, se analizaron los datos en el software Microsoft Excel.

Mediante la siguiente formula, se pudo expresar en porcentaje, los resultados de inhibición enzimática:

$$\% I = 100 - \frac{M - BM}{C - BC} \times 100$$

Donde cada zona de la microplaca de 96 pocillos corresponde a:

- M: lectura de la zona muestra
- BM: lectura de la zona blanco muestra
- C: lectura de la zona control
- BC: lectura de la zona blanco control

2.13 Curva de inhibición enzimática para calcular el IC₅₀

Se graficó la curva de inhibición ubicando en el eje X la concentración del extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora*, y en el eje Y los porcentajes de inhibición enzimática. A ésta grafica se le agregó una línea de tendencia logarítmica y con la ecuación de la recta, se calculó el IC₅₀

Los valores de IC₅₀ son las medias (\pm desviación estándar) de tres determinaciones individuales. Cada determinación fue realizada por triplicado (Ortiz et al., 2016: p. 7)

Es una medida *in vitro*, posiblemente la más relevante, usada para determinar la concentración inhibitoria semi máxima o al 50%, es decir, muestra el resultado de la concentración de un fármaco que se requiere para inhibir a la mitad la actividad enzimática (Aykul y Martinez-Hackert, 2016: p. 1).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

El contenido de este capítulo muestra los resultados obtenidos del análisis del extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora* en sus variedades de flor de color amarillo y naranja, a partir de la metodología expuesta del anterior capítulo.

3.1 Extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora*

Para obtener el extracto alcaloidal de *Phaedranassa viridiflora* se pesaron 20 g de planta seca y triturada. Tras el proceso de extracción metanólica de los alcaloides, se obtuvo el siguiente rendimiento:

Tabla 3-1 Rendimiento de los extractos alcaloidales de las dos variedades de la especie *Phaedranassa viridiflora*.

N.º muestra	Tipo de extracto	Muestra vegetal	Color de flor	Muestra seca (g)	Volumen de metanol (mL)	Extracto de alcaloides (mg)	Rendimiento (%)
1	Metanólico	Bulbo de <i>Phaedranassa viridiflora</i>	Amarilla	20	800	31,1	0,1555
2	Metanólico	Bulbo de <i>Phaedranassa viridiflora</i>	Naranja	20	800	30,5	0,1525

Realizado por: Cinthia Erazo

El rendimiento de extracto alcaloidal de la variedad amarilla de *Phaedranassa viridiflora* fue de 0,1555 %, un valor ligeramente mayor con respecto al resultado de la variedad naranja de *Phaedranassa viridiflora*, que fue de 0,1525 %. La diferencia de resultados del porcentaje de rendimiento está sujeto al tipo de solventes empleados, al método de extracción, a la calidad de los reactivos, difiere en especies y en la parte de la planta que usa para investigar (Apaza y Calienes, 2016: p. 3). Por lo que la diferencia de color si incidió en el resultado.

3.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

El análisis mediante CG-EM permitió identificar los alcaloides presentes en las muestras de extractos de bulbos de *Phaedranassa viridiflora*, tras su extracción. El perfil alcaloidal de cada variedad se exponen en la tabla 3-2, así mismo se muestra los tiempos e índice de retención de los compuestos identificados.

Tabla 3-2 Identificación de alcaloides mediante CG-EM de los extractos alcaloidales de *P. viridiflora* de variedad amarilla y naranja

Especie	N.º	Tipo de alcaloide	Rt	RI	µg gal/100 mg PS
<i>Phaedranassa viridiflora amarilla</i>	1	Hemantamina	26,4274	2663,4	14,1027
	2	Homolicorina	28,0817	2779,1	13,0649
	3	Tazetina	26,6008	2675,3	11,4884
<i>Phaedranassa viridiflora naranja</i>	1	Hemantamina	26,4857	2667,4	33,7620
	2	Tazetina	26,6531	2678,8	21,7864
	3	Galantamina	22,8357	2426,1	18,8452
	4	Licorina	28,1341	2782,8	11,3649
	5	Incartina	28,0102	2774,1	10,0752
	6	Galantina	27,3412	2726,8	9,9787

Fuente: Universitat de Barcelona (2018)

Realizado por: Jaume Bastidas / Laura Torras

Interpretación: Tiempo de retención (Rt), índice de retención (RI), peso seco (PS).

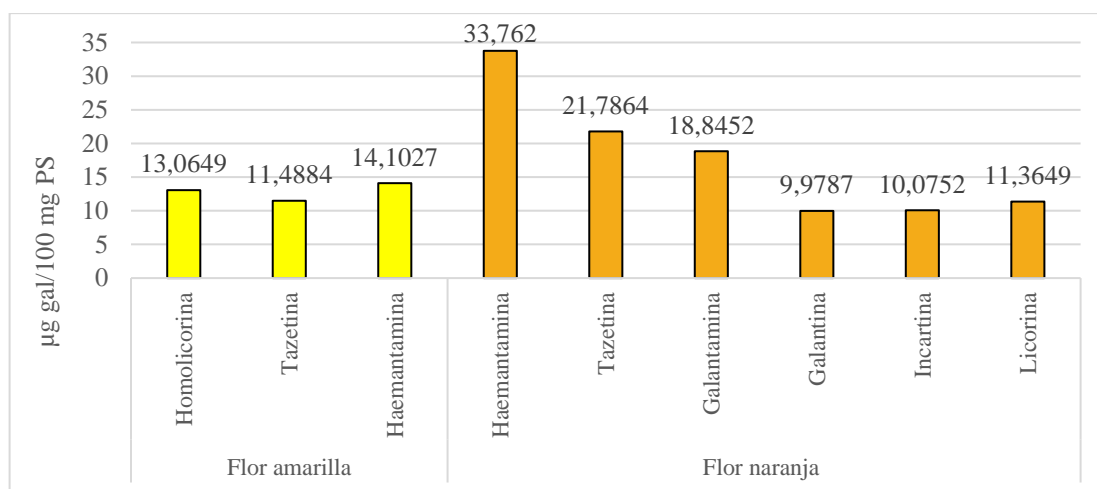


Gráfico 3-1 Cantidad de alcaloides de los extractos alcaloidales de las variedades de *P. viridiflora* amarilla y naranja (µg gal/100 mg PS)

Realizado por: Cinthia Erazo

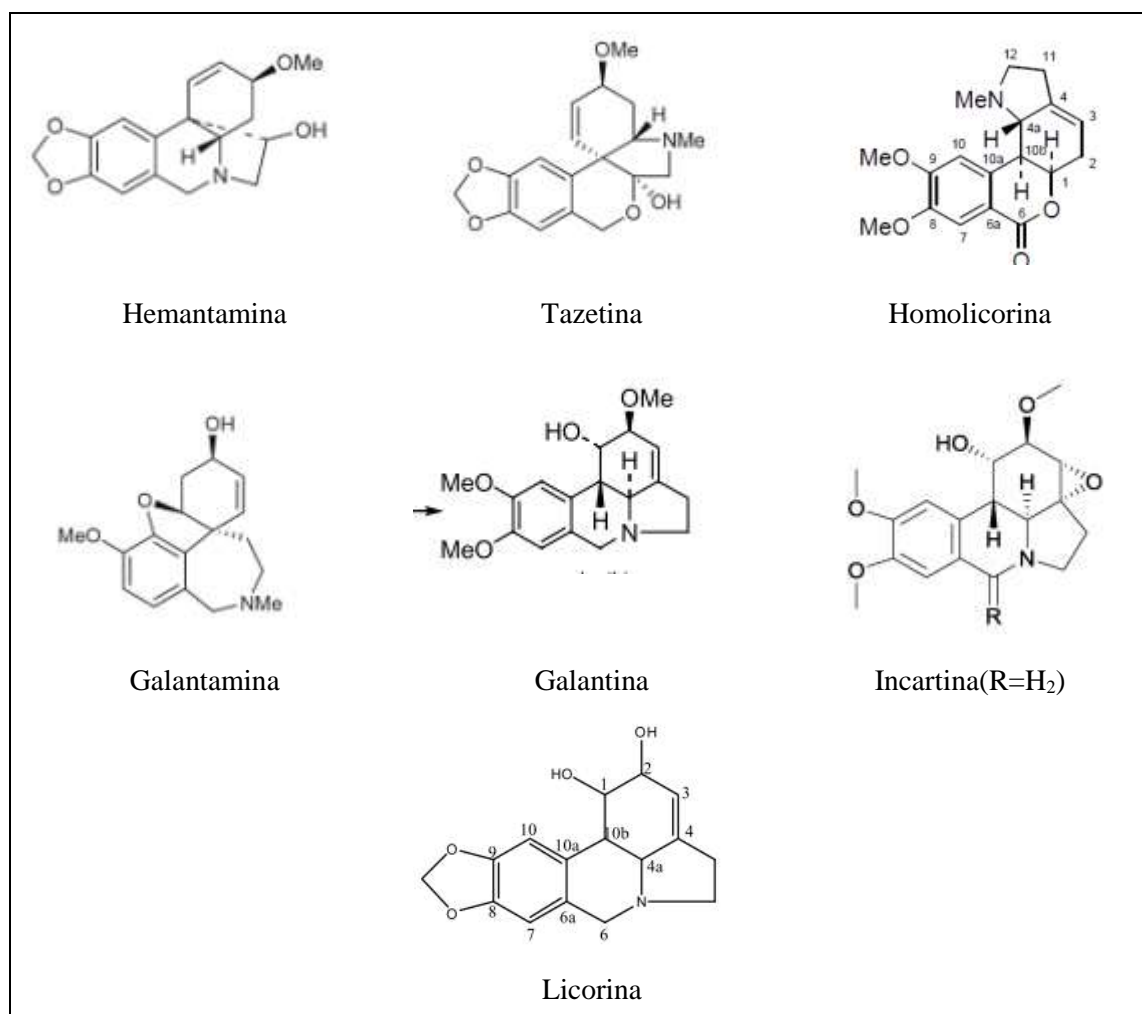


Figura 3-1 Estructuras de alcaloides presentes en el bulbo de *P. viridiflora* de variedad amarilla y naranja

Fuente: (Bastida et al., 2011)(Jin y Yao, 2019)

El bulbo de la variedad amarilla de la especie *P. viridiflora* presentó tres alcaloides, la hemantamina, tazetina y homolicorina; siendo hemantamina el alcaloide más abundante con 14,1027 (µg gal/100 mg PS). En cambio, en el extracto de alcaloides del bulbo de la variedad naranja de *P. viridiflora* se determinó la presencia de seis alcaloides: la galantamina, hemantamina, tazetina, galantina, incartina y, por último, licorina. De igual manera, hemantamina fue el alcaloide mayoritario con 33,7620 (µg gal/100 mg PS). Es importante destacar que únicamente en la variedad naranja de *P. viridiflora* se encontró el alcaloide galantamina en una concentración de 18,8452 (µg gal/100 mg PS).

Hay dos alcaloides que coinciden en ambas variedades, tazetina y hemantamina. La hemantamina, alcaloide común en ambos tipos de planta y, el más abundante, es derivado de norbelladina debido a un acoplamiento fenol oxidativo (de tipo *para para*), haciendo referencia que los alcaloides de presentes tipo hemantamina, son exclusivos en el género *Narcisuss* (Bastida et al., 2011: p. 14).

Se han estudiado distintas especies del género *Phaedranassa* de Ecuador (Jaramillo, 2019; Inca, 2017; Salazar, 2017; Montero, 2018; Baldeon, 2018), observando que la especie *Phaedranassa glauciflora* contiene este metabolito en 1.19%. En el tamizaje fitoquímico en la especie *Phaedranassa schizantha* (Vinueza, 2014: p. 49), hemantamina, fue uno de los alcaloides más abundantes, encontrándose en concentraciones del 8,060%. De igual manera, en la especie *S. aurantiacum* fue identificado el alcaloide hemantamina en el extracto purificado, siendo el más abundante con un 17,53% (Acosta, 2013, p. 31).

Hemantamina ha sido estudiado como un novedoso agente anticancerígeno debido a su capacidad de superación en la resistencia de las células cancerosas a la apoptosis, acaparando gran cantidad de estudios sobre el objetivo de éste alcaloide, los cuales indican que se centra en el ribosoma (Pellegrino et al., 201: p. 13). Además ha presentado actividades antiinflamatorias, antimaláricas y antibacterial (Peralta, 2014: p. 8)

Asimismo en cada de una especies antes mencionadas, se ha encontrado el alcaloide galantamina (Gal), característico de la familia Amaryllidaceae, por sus propiedades y uso en el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer, encontrándose en mayor proporción en *Phaedranassa cuencana* con un valor de 18,90% (Jaramillo, 2019: p. 45).

Al contrario que la galantamina, un alcaloide con efectos reversibles y competitivos sobre la acetilcolinesterasa, el alcaloide hemantamina (HAE), no afecta a la actividad de las colinesterasas.

La tazetina es un alcaloide que tiene efectos antimalarial y actividad antineoplásicas (Acosta et al., 2014: p. 3), además es considerado como un débil hipertensivo (Cabezas et al., 2007: p. 3), mostrando efectos similares a la hemantamina.

La homolicorina es un tipo de alcaloide derivado de licorina se caracteriza por ser tóxico (Cabezas et al., 2007: p. 3). Esta toxicidad, según estudios, se debe a que los alcaloides de este tipo presentan efectos citotóxicos sobre las células LMTK (línea celular de fibroblasto murínico) fibroblásticas no tumorales, incluyendo también, efectos sobre las células tumorales y actividad retroviral (Bastida et al., 2011: p. 21). Dicho alcaloide si tiene registrado una actividad inhibitoria hacia las enzimas colinesterasas (Ortiz et al., 2016: p. 3).

En cambio, la licorina también es un alcaloide ampliamente distribuido en la familia Amaryllidaceae. Estudios demuestran que posee un efecto anticancerígeno, puede combatir células cancerígenas modificando la actina del citoesqueleto de éstas células (Soto y Leiva, 2015: p. 281). Varios son los estudios que intentan explicar el mecanismo biológico de la licorina, algunos indican que interfiere en la biosíntesis de la vitamina C, otros informan de efectos pro-apoptóticos, además, se observó la detección del ciclo celular después del tratamiento con licorina (Lamoral-Theys et al., 2010, p. 42).

3.3 Determinación de la actividad inhibitoria de *Phaedranassa viridiflora* sobre AChE y BuChE

Tras el acondicionamiento del laboratorio en cuanto a temperatura se refiere, a la activación de las enzimas, a la preparación de reactivos y al control de tiempos, se procedió a efectuar el ensayo de inhibición enzimática de AChE y BuChE, que se realizó siguiendo el método de Ellman et al. (1961: p. 3), con algunas modificaciones de Ortiz et al. (2016: p. 7).

Se realizaron dos diluciones al extracto alcaloidal de *Phaedranassa viridiflora*, de cada variedad, con la finalidad de comparar resultados y, encontrar la mejor la actividad de inhibición sobre AChE y BuChE. La primera disolución consistió en añadir metanol, y la segunda disolución consistió en añadir a la dilución 1 dimetilsulfóxido, DMSO. Al ser un buen cosolvente, permitió una mejor solubilidad del extracto de alcaloides. En este caso, se observó una mejor disolución de las muestras.

Para realizar el primer análisis se establecieron concentraciones iniciales de los extractos de alcaloides de las variedades de *Phaedranassa viridiflora*, tanto para la determinación de inhibición enzimática de acetilcolinesterasa como para la de butirilcolinesterasa.

Después de obtener los primeros resultados del porcentaje de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales frente a la inhibición de las enzimas colinesterasas y, por lo consecuente sus IC₅₀, se realizó un segundo análisis con un mayor número de concentraciones.

3.3.1 Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides sobre acetilcolinesterasa

3.3.1.1 Prueba 1: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides disuelto en metanol

PRIMER ANÁLISIS

Tabla 3-3 Porcentajes iniciales de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales sobre AChE. Primer análisis

<i>Phaedranassa viridiflora</i> amarilla		<i>Phaedranassa viridiflora</i> naranja	
Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición sobre AChE (%)	Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición sobre AChE (%)
100	86,69 ± 1,99	100	91,91 ± 1,74
50	77,71 ± 1,17	50	87,21 ± 0,78
10	52,97 ± 1,73	10	73,89 ± 0,66
1	8,50 ± 4,17	1	47,52 ± 0,26

Realizado por: Cinthia Erazo

Para el primer análisis se utilizaron cuatro concentraciones, 100, 50, 10 y 1 µg/mL. Cada valor que se muestra en la siguiente tabla, son el resultado de tres repeticiones consecutivas de cada concentración, con el fin de evaluar entre que rangos aproximadamente se encuentra el IC₅₀ y saber a que concentraciones se debe ampliar.

Para ambas plantas se tanto en el caso de *Phaedranassa viridiflora* de variedad amarilla y variedad naranja, se observa que el IC₅₀ se encontraba alrededor de la concentración de 1 y 10. En función de esto se procedió a aumentar a siete concentraciones.

SEGUNDO ANÁLISIS

Partiendo de los resultados en el primer análisis, se emplearon nuevas concentraciones diferentes para cada extracto: 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 µg/mL para la variedad amarilla de *P. viridiflora* y 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 µg/mL en la variedad naranja de *P. viridiflora*.

Cada valor que se muestra en la siguiente tabla, son medias \pm DE de tres determinaciones individuales realizadas por triplicado.

Tabla 3-4 Porcentajes de inhibición enzimática de los extractos alcaloides sobre AChE. Segundo análisis

<i>Phaedranassa viridiflora</i> amarilla		<i>Phaedranassa viridiflora</i> naranja	
Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de inhibición sobre AChE	Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de inhibición sobre AChE
100	$89,98 \pm 1,07$	10	$88,63 \pm 1,24$
50	$83,13 \pm 1,21$	5	$79,26 \pm 0,59$
25	$71,39 \pm 1,53$	2,5	$69,03 \pm 1,42$
15	$63,57 \pm 1,91$	1	$48,86 \pm 0,71$
10	$55,26 \pm 1,25$	0,5	$37,50 \pm 1,89$
5	$40,10 \pm 1,39$	0,25	$21,31 \pm 1,30$
1	$9,78 \pm 1,43$	0,1	$4,12 \pm 1,89$

Realizado por: Cinthia Erazo

Por un lado, la variedad amarilla de *P. viridiflora*, a una concentración aproximada de 10 $\mu\text{g/mL}$, inhibe en un 50% a la enzima AChE. Para obtener el valor exacto de IC₅₀, se deben establecer concentraciones que este entre el rango de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

Mientras que en la variedad naranja de *P. viridiflora* requiere de una concentración aproximada de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ para que la actividad enzimática de AChE inhiba a un 50% a la enzima, en este caso inhibió su actividad en un $69,03 \pm 1,42\%$. Por lo tanto, el valor de IC₅₀ se encuentra entre las concentraciones 1 y 2,5 $\mu\text{g/mL}$, por lo que se procede a establecer nuevas concentraciones que permitan determinar el valor de IC₅₀.

Con estas concentraciones y sus respectivos resultados, se pudo corroborar con bibliografía (López et al., 2002b: p. 4), que indica que deben haber dos valores mayores al 50% de inhibición sobre la actividad enzimática y, dos valores por debajo de dicho porcentaje.

Tabla 3-5 Actividad de inhibición enzimática de los extractos alcaloides de las dos variedades de *P. viridiflora* y galantamina, ensobre AChE. Segundo análisis

Componente		IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	R ²
<i>Phaedranassa viridiflora</i> amarilla	Galantamina	$0,416 \pm 0,027$	0,99
	Extracto alcaloidal	$8,348 \pm 0,58$	0,99

<i>Phaedranassa viridiflora</i> naranja	Galantamina	0,63 ± 0,07	0,99
	Extracto alcaloidal	1,104 ± 0,98	0,99

Realizado por: Cinthia Erazo

Mediante la graficación de la curva de inhibición de los valores de la tabla 3-4, y la inserción de la línea de tendencia logarítmica se obtuvo los valores de IC₅₀, cada uno con un valor de R²= 0,99. Se determinó que la variedad naranja de *P. viridiflora* requiere una concentración de inhibición de 1,104 µg/mL para inhibir el 50% de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, valor muy similar al IC₅₀ de la galantamina (0,63 µg/mL). De igual manera la variedad amarilla de *P. viridiflora* tiene un IC₅₀= 8,348, mayor al de la galantamina (0,416 µg/mL).

3.3.1.2 Prueba 2: actividad inhibitoria del extracto de alcaloides disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)

Tabla 3-6 Porcentajes de inhibición enzimática de los extractos sobre AChE disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)

<i>Phaedranassa viridiflora</i> amarilla		<i>Phaedranassa viridiflora</i> naranja	
Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición sobre AChE	Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición sobre AChE
75	87,76 ± 1,72	10	88,37 ± 0,59
50	84,56 ± 1,40	5	79,89 ± 1,22
25	71,84 ± 0,66	2,5	69,82 ± 0,87
15	63,69 ± 0,53	1	51,36 ± 2,17
7,5	52,18 ± 0,66	0,5	38,23 ± 1,34
5	42,14 ± 0,84	0,25	21,31 ± 0,23
1	9,29 ± 1,50	0,1	5,84 ± 1,49

Realizado por: Cinthia Erazo

La variedad amarilla de *Phaedranassa viridiflora*, se usaron las concentraciones a 1; 5; 7,5; 15; 25; 50 y 75 µg/mL. Para la variedad naranja de *Phaedranassa viridiflora* se usaron concentraciones de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 µg/mL, con la finalidad de encontrar el valor del IC₅₀.

En las concentraciones seleccionadas para los extractos, mismos que mostraron 2 valores de inhibición superiores y 2 inferiores al 50 % acorde con la bibliografía (López et al., 2002b: p. 4).

Siendo estos 7,5 y 15 µg/mL y, las concentraciones de 5 y 1 µg/mL, respectivamente en el extracto de *P. viridiflora* de flor amarilla.

De la misma manera sucedió en las concentraciones del extracto de la variedad naranja de *P. viridiflora* que en esta disolución se pudo validar acorde a bibliografía, obteniéndose 2 valores de inhibición superiores y 2 inferiores al 50 % de inhibición enzimática. 1 y 2,5 µg/mL fueron las siguientes concentraciones que inhiben por encima del 50%, y por debajo de dicho valor se usó las concentraciones 0.5 y 0.25 µg/mL. En el extracto de *P. viridiflora* de flor naranja se obtuvo que a una concentración de 10 µg/mL había una inhibición sobre AChE del $88,37 \pm 0,5$ 9%. La menor concentración (0.1 µg/mL) pudo inhibir a la acetilcolinesterasa en un $5,84 \pm 1,49$ %.

Cada extracto tuvo una ligera mejoría en el valor de IC₅₀ tras realizar la disolución 2 con el DMSO (0,1 % V/V). Se observa una disminución de los valores de IC₅₀. El valor más bajo de IC₅₀ se obtuvo de la especie *P. viridiflora* de color naranja (1,02 µg/mL). Pese a la realización de dilución con el solvente B, la *P. viridiflora* de flor amarilla tuvo un valor de IC₅₀ de 7,82 µg/mL. La galantamina tuvo un valor (IC₅₀ = 0,57 µg/mL) muy cercano al de la variedad naranja de *Phaedranassa viridiflora*, en la dilución 2.

Tabla 3-7 Valores de IC₅₀ de *P. viridiflora* y galantamina sobre la inhibición de AChE disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)

Componente	IC ₅₀ µg/mL ^a	
	AChE	R ²
<i>Phaedranassa viridiflora</i> de flor amarilla	7,82 ± 0,13	0,99
Galantamina ^b	0,40 ± 0,03	0,98
<i>Phaedranassa viridiflora</i> de flor naranja	1,02 ± 0,05	0,99
Galantamina ^c	0,57 ± 0,07	0,99

Realizado por: Cinthia Erazo

^aIC₅₀ valores de las medias ± DE de tres determinaciones individuales realizadas por triplicado. ^b Gal es el compuesto de referencia de *P. viridiflora* de flor amarilla. ^c Gal es el compuesto de referencia de *P. viridiflora* de flor naranja.

3.3.2 Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides sobre butirilcolinesterasa

3.3.2.1 Prueba 1: Actividad inhibitoria del extracto de alcaloides disuelto en metanol

PRIMER ANÁLISIS

Tabla 3-8 Porcentajes iniciales de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales sobre BuChE. Primer análisis

<i>Phaedranassa viridiflora</i> amarilla		<i>Phaedranassa viridiflora</i> naranja	
Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición sobre BuChE (%)	Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición sobre BuChE (%)
100	56,53 ± 1,99	100	63,23 ± 1,50
50	40,73 ± 1,39	50	43,64 ± 1,39
10	20,36 ± 1,23	10	6,53 ± 1,91
1	-1,52 ± 0,93	1	-37,80 ± 3,08

Realizado por: Cinthia Erazo

Para la determinación de la actividad inhibitoria de los extractos sobre BuChE también se utilizaron cuatro concentraciones: 100, 50, 10 y 1 µg/mL. Cada valor que se muestra en la siguiente tabla, son el resultado de tres repeticiones consecutivas de cada concentración, con el fin de evaluar entre que rangos aproximadamente se encuentra el IC₅₀ y saber a que concentraciones se debe ampliar.

Para ambas plantas se tanto en el caso de *Phaedranassa viridiflora* de variedad amarilla y variedad naranja, se observa que el IC₅₀ se encontraba alrededor de la concentración de 50 y 100. En función de esto se procedió a aumentar a siete concentraciones.

SEGUNDO ANÁLISIS

Partiendo de los resultados en el primer análisis, se emplean nuevas concentraciones tales como 300, 350, 200, 100, 50 y 10 µg/mL en el extracto de *P. viridiflora* de flores amarillas y concentraciones de 100, 50, 10, 5, 1 y 0.5 µg/mL en el extracto de *P. viridiflora* de flores naranjas.

Tabla 3-9 Porcentajes de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales sobre BuChE. Segundo análisis

<i>Phaedranassa viridiflora</i> amarilla		<i>Phaedranassa viridiflora</i> naranja	
Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición sobre BuChE (%)	Concentración del extracto alcaloidal (µg/mL)	Porcentaje de inhibición sobre BuChE (%)
300	64,81 ± 1,02	100	55,42 ± 1,58

250	$53,37 \pm 0,39$	50	$44,09 \pm 1,54$
200	$50,51 \pm 0,64$	10	$22,41 \pm 1,07$
100	$33,96 \pm 0,15$	5	$13,30 \pm 1,64$
50	$23,23 \pm 1,27$	1	$0,74 \pm 1,85$
10	$-1,01 \pm 1,52$	0,5	$-10,22 \pm 1,78$

Realizado por: Cinthia Erazo

Por un lado, la variedad naranja de *P. viridiflora* requiere de una concentración aproximada de 100 µg/mL para que la actividad enzimática de BuChE inhiba a un 50% a la enzima, en este caso inhibió su actividad en un $55,42 \pm 1,58$ %. Por lo tanto, el valor de IC₅₀ se encuentra entre las concentraciones 50 y 100 µg/mL.

Mientras que en la variedad amarilla de *P. viridiflora*, se requiere aproximadamente una concentración de 200 µg/mL, para inhibir un 50% a la enzima BuChE. Para obtener el valor exacto de IC₅₀, se deben establecer concentraciones entre el rango de 200 y 250 µg/mL.

Con estas concentraciones y sus respectivos resultados del extracto alcaloidal de la variedad amarilla de *Phaedranassa viridiflora*, se pudo corroborar su validación con bibliografía (López et al., 2002b: p. 4), que indica que deben haber dos valores mayores al 50% de inhibición sobre la actividad enzimática y, dos valores por debajo de dicho porcentaje.

Es por ello que las concentraciones utilizadas en la tabla 3-7 de la variedad naranja se modifican ya que no se pudo evidenciar lo antes mencionado.

Tabla 3-10 Actividad de inhibición enzimática de los extractos alcaloidales de las dos variedades de *P. viridiflora* y galantamina, sobre BuChE. Segundo análisis

Componente		IC ₅₀ (µg/mL)	R ²
<i>Phaedranassa viridiflora</i> de flor amarilla	Galantamina	$13,75 \pm 1,45$	0,99
	Extracto alcaloidal	$239,57 \pm 19,61$	0,99
<i>Phaedranassa viridiflora</i> de flor naranja	Galantamina	$14,54 \pm 0,78$	0,99
	Extracto alcaloidal	$84,82 \pm 4,98$	0,99

Realizado por: Cinthia Erazo

Mediante la graficación de la recta de los valores de la tabla 3-7, y la inserción de la línea de tendencia logarítmica se obtuvo los valores de IC₅₀, cada uno con un valor de R²= 99. Se determinó que el extracto más activo para inhibir a un 50% la actividad a la enzima

butirilcolinesterasa fue el de la especie *P. viridiflora* de flor naranja que requiere una concentración de $84,82 \pm 4,98 \mu\text{g/mL}$, igualmente se observa que es superior al IC_{50} de la galantamina ($14,54 \mu\text{g/mL}$), mostrando una actividad media.

En cambio *P. viridiflora* de flor amarilla tiene un $\text{IC}_{50} = 239,57 \pm 19,61$ que es mayor al del alcaloide control galantamina ($0,416 \mu\text{g/mL}$), representando una actividad muy escasa.

3.3.2.2 Prueba 2: actividad inhibitoria del extracto de alcaloides disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)

Tabla 3-II Porcentajes de inhibición enzimática de los extractos sobre BuChE disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)

<i>Phaedranassa viridiflora</i> de flor amarilla		<i>Phaedranassa viridiflora</i> de flor naranja	
Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de inhibición sobre BuChE (%)	Concentración del extracto alcaloidal ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de inhibición sobre BuChE (%)
300	$71,36 \pm 0,66$	200	$68,01 \pm 1,03$
250	$66,01 \pm 0,50$	175	$64,50 \pm 1,25$
200	$61,18 \pm 0,94$	125	$59,56 \pm 1,07$
100	$45,17 \pm 1,68$	100	$54,44 \pm 0,86$
50	$25,25 \pm 1,60$	75	$47,54 \pm 1,20$
10	$-5,72 \pm 0,80$	25	$24,16 \pm 2,13$
		10	$1,67 \pm 2,43$

Realizado por: Cinthia Erazo

Para la actividad inhibitoria se uso las concentraciones 300; 250; 200; 100; 50 y $10 \mu\text{g/mL}$ en la variedad amarilla de *Phaedranassa viridiflora*. Para la variedad naranja de *Phaedranassa viridiflora* se usaron concentraciones de 200; 175; 125; 100; 75; 25 y 10, con la finalidad de encontrar el valor del IC_{50} .

Como se mencionó, el DMSO, es un buen cosolvente, que permitió una mejor solubilidad del extracto de alcaloides. Cada valor que se muestra en la siguiente tabla, son medias \pm DE de tres determinaciones individuales realizadas por triplicado.

En éste análisis, para la determinación de la inhibición enzimática de BuChE, también se cambiaron las concentraciones con respecto a la disolución 1, mismas que se muestran en la tabla 3-10.

Las concentraciones seleccionadas para los extractos, mostraron 2 valores de inhibición superiores y 2 inferiores al 50%, acorde con la bibliografía (López et al., 2002b: p. 4). Siendo estos 200 – 250 µg/mL y 100 – 50 µg/mL en el caso de la variedad naranja de *Phaedranassa viridiflora*. Los valores en el caso de la variedad amarilla de *Phaedranassa viridiflora* fueron 125- 100 µg/mL y 75 – 25 µg/mL.

Tabla 3-12 Valores de IC₅₀ de *P. viridiflora* y galantamina, sobre la inhibición de BuChE disuelto en metanol + DMSO (0,1 % V/V)

Componente	IC ₅₀ µg/mL ^a	
	BuChE	R ²
<i>Phaedranassa viridiflora</i> amarilla	125,51 ± 3,03	0,99
Galantamina ^b	12,82 ± 1,04	0,98
<i>Phaedranassa viridiflora</i> naranja	84,28 ± 4,28	0,99
Galantamina ^c	13,53 ± 1,28	0,99

Realizado por: Cinthia Erazo

^aIC₅₀ valores de las medias ± DE de tres determinaciones individuales realizadas por triplicado. ^b Gal es el compuesto de referencia de *P. viridiflora* de flor amarilla. ^c Gal es el compuesto de referencia de *P. viridiflora* de flor naranja.

Al igual que en la determinación de inhibición enzimática de AChE, cada extracto tuvo una mejoría en el valor de IC₅₀ tras realizar la disolución 2 con el metanol + DMSO (0,1 % V/V)

3.3.2.3 Generalizado

Se usó el DMSO (cosolvente B) por ser un solvente comúnmente usado en la extracción de alcaloides. Se ha empleado en otros estudios como el de Nyambuya, Mautsa y Mukanganyama(2017: p. 4), quien utilizó el DMSO (cosolvente B) para ver los efectos del solvente en los extractos y, también en la investigación Pellegrino et al. (2018, p: 15) que usaron el mismo solvente (1% máximo) para la obtención de mejores resultados de solubilidad y por ende de actividad inhibitoria frente sobre las enzimas colinesterasas. Los resultados de las actividades inhibitorias de los dos extractos y sus componentes de referencia fueron expresados como IC₅₀ (µg/mL).

El aspecto del extracto de alcaloides de *P. viridiflora* amarilla era polvoso, en cambio el de flores naranja tenía un aspecto más heterogéneo y gomoso. La diferencia entre los extractos, evidencia una heterogenicidad de alcaloides.

Los alcaloides derivados de *P. viridiflora* de hojas amarillas presenta una elevada importancia frente a la inhibición de AChE, pues presenta una alta actividad ($IC_{50}=7,82 \pm 0,13\mu\text{g/mL}$), considerando que no se ha aislado cada componente. Se observa que tiene una actividad de inhibición débil para BuChE ($IC_{50}= 125,51 \pm 3,03\mu\text{g/mL}$) la actividad es menor. La variedad amarilla de *Phaedranassa viridiflora* tuvo un cambio considerable en el valor de IC_{50} ya que en la dilución 1 tuvo un valor de $IC_{50} = 239,57 \mu\text{g/mL}$.

Los resultados expresados en IC_{50} de *Phaedranassa viridiflora* de flor naranja para AChE es de $1,02 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, considerándose una actividad inhibitoria muy alta. Para BuChE $84,28 \pm 4,28 \mu\text{g/mL}$, considerándose moderadamente alta. El compuesto de referencia, galantamina, presenta valores de IC_{50} menores en ambos casos. En cambio, en la variedad naranja *Phaedranassa viridiflora*, los valores de se asemejan de IC_{50} en ambas pruebas.

El extracto de la variedad amarilla de *Phaedranassa* tiene alcaloides como la hemantamina, en mayor proporción, seguido de homolicorina y tazetina, que son de tipo isoquinolínicos. En el caso de la hemantamina, se ha evidenciado que tienen una actividad antitumoral y no se ha reconocido efectos sobre AChE o BuChE (Kukhanova et al., 1983 citado en Pellegrino et al., 2018: p. 4). La buena actividad sobre AChE puede estar asociado al alcaloide homolicorina, por los registros de su actividad frente a enzimas colinesterasas (Ortiz et al., 2016: p. 3).

El extracto alcaloidal de *P. viridiflora* naranja mostró que tiene galantamina en su composición, lo cual puede sugerir que este alcaloide es el responsable de la observada actividad ya que presentó el menor de los valores de IC_{50} . Se evidenció una actividad muy alta frente a AChE ($1,02 \pm 0,05\mu\text{g/mL}$) y una actividad moderadamente alta frente a BuChE ($84,28 \pm 4,28 \mu\text{g/mL}$). Sus valores, se asemejan a la galantamina que presentó un valor de (AChE $IC_{50} = 0,57 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ y BuChE $IC_{50} = 13,53 \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$) similar al reportado en bibliografía (AChE $IC_{50} = 0.48 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ y BuChE $IC_{50} = 22.39 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$) (Ortiz et al., 2012: p. 4). Como es de esperar, los alcaloides de tipo galantamina son los más potentes inhibidores de colinesterasas, encontrados unicamente en la familia Amaryllidaceae. Además de los otros alcaloides que se identificaron mediante CG-EM como: hemantamina, en mayor proporción, seguido de tazetina, licorina, incartina y galantina.

En las especies de *P. viridiflora* de flor amarilla y de flor naranja están presentes homolicorina y licorina, respectivamente. Se ha evidenciado que los alcaloides de tipo licorina y sus derivados exhiben un incremento significativo en la actividad inhibitoria de AChE (Cortes et al., 2014: p. 16).

Ambas especies de plantas mostraron mejores resultados de IC₅₀ para AChE. Además de otras actividades como citotóxicos, analgésicos o antiinflamatorios (Cabezas et al., 2007: p. 3).

En previas investigaciones, las especies de *Phaedranassa* también mostraron actividad inhibitoria sobre AChE y BuChE. Aunque es muy complicado comparar los resultados de diferentes estudios, se ha evidenciado que los alcaloides de tipo galantamina y licorina son los más efectivos inhibidores de colinesterasas, sobretodo en la inhibición de AChE (Cortes et al., 2014: p. 15).

De manera general, en la especie *P. cuencana* se obtuvo valores similares al de *P. viridiflora* de flor naranja frente a la inhibición de AChE (IC₅₀ de $1,12 \pm 0,05$ µg/mL) (Jaramillo, 2019, p. 53). En cuanto a la determinación de la inhibición sobre BuChE, la especie de *Phaedranassa* que más se asemeja es la *P. glauciflora* ($323,62 \pm 3,51$ µg/mL) (Baldeon, 2018: p. 49), evidenciándose una actividad escasa, como es el caso de la *P. viridiflora* naranja. Siendo ésta, la especie del género *Phaedranassa* con la actividad de inhibición sobre AChE más elevada.

El interés en la búsqueda de nuevos recursos de inhibidores de AChE y BuChE de especies de Amarillydaceae, endémicas de Ecuador, para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer, proviene de encontrar componentes con mayores efectos terapéuticos y en la disminución de los efectos adversos que muestran los actuales medicamentos como la rivastigmina, donepezilo y galantamina. Intentando tratar el principal problema de obtención de galantamina, ya que no es económicamente sintetizable, por lo que se extrae principalmente de los géneros *Galanthus* y *Narcissus* (Arango, 2008: p. 52).

La butirilcolinesterasa es más abundante en áreas que se afectan muy temprano en las demencias como la límbica, por lo cual los medicamentos que tienen doble acción inhibitoria, es decir, frente a BuChE y AChE, son muy útiles en el manejo del trastorno de comportamiento de estos pacientes (Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar: 2003: p. 5).

Como consecuencia, ambas especies de plantas pueden ser consideradas como un posible objetivo en el uso como inhibidores de colinesterasas. Los resultados muestran que la *P. viridiflora* de color naranja contribuye a la búsqueda de nuevos productos para el tratamiento de la EA, por presentar un balance en la inhibición de las actividades inhibitorias sobre AChE y BuChE, similar a los fármacos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

CONCLUSIONES

- Los extractos alcaloidales obtenidos a partir de bulbos de *P. viridiflora* de variedades naranja y amarilla tuvieron un rendimiento de extracción de 0,1555% y 0,1525%, respectivamente.
- Mediante el análisis de CG-EM, de *P. viridiflora* de variedad amarilla, se identificaron 3 alcaloides, siendo hemantamina el mayoritario, seguido de homolicorina y tazetina. En cuanto a la variedad naranja, se identificaron 5 alcaloides: hemantamina, componente mayoritario, seguido de tazetina, galantamina, licorina, incartina y galantina.
- Se determinó que el DMSO mejoró la actividad inhibitoria de todos los extractos de estudio y que la variedad naranja de *P. viridiflora* presentó la mayor actividad inhibitoria sobre AChE y BuChE.
- *Phaedranassa viridiflora* de flor naranja mostró una actividad inhibitoria muy alta sobre AChE ($1,02 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$), similar a galantamina ($\text{IC}_{50} = 0,57 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$). La actividad inhibitoria sobre BuChE fue moderadamente alta (IC_{50} de $84,28 \pm 4,28 \text{ ug/mL}$) respecto a galantamina (IC_{50} de $13,53 \pm 1,28 \text{ ug/mL}$).
- La variedad amarilla de *P. viridiflora* mostró una alta actividad de inhibición sobre AChE ($7,82 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$) y una actividad de inhibición débil sobre BuChE ($125,51 \pm 3,03 \mu\text{g/mL}$).

RECOMENDACIONES

- Investigar a la variedad naranja de *P. viridiflora* por su elevado contenido de hemantamina, alcaloide considerado como un nuevo agente anticancerígeno.
- Las especies de *P. viridiflora* pueden ser potentes inhibidores de colinesterasas que se utilizan en el tratamiento de la EA. En el caso de la variedad naranja de *Phaedranassa viridiflora* presenta una importante cantidad de galantamina. Como consecuencia, ambas variedades podrían ser consideradas como objetivo en la búsqueda de nuevas fuentes de inhibidores de colinesterasas.
- Uno de los factores a tener en cuenta para el proceso de extracción de alcaloides, es la utilización de los bulbos de las plantas es estado de floración debido a que aumenta la concentración de alcaloides.
- Desarrollar cultivos celulares vegetales de la especie *Phaedranassa viridiflora*, variedad amarilla y la variedad naranja para conservarle. También realizar micropropagación y para producir los alcaloides in vitro por las importantes características farmacéuticas.

GLOSARIO

A₍₁₋₁₀₎	Receptor nicotínico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
APP	Proteína precursora del péptido beta amiloide
Aβ	Proteína beta amiloide
BuChE	Butirilcolinesterasa
CG-EM	Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Enfermedad de Alzheimer
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
FDA	Food and Drug Administration
Gal	Galantamina
HAE	Hemantamina
IC₅₀	Concentración inhibitoria semi máxima
LMTK	Línea celular de fibroblasto murínico
M₍₁₋₅₎	Receptor muscarínico
PET	Tomografía por emisión de positrones
PS	Peso seco
TAC	Tomografía axial computarizada

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Karen, 2013. *Identificación de los alcaloides de Stenomesson aurantiacum (Kunth) Herb.* [en línea]. S.l.: Universitat de Barcelona. [Consulta: 15 febrero 2019]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1/T-SENESCYT-00674.pdf>.

ACOSTA, Karen, et al. *Identification of the alkaloids of stenomesson aurantiacum (Kunth) herb an amaryllidaceae species from the ecuadorian andes.* Pharmacologyonline, 2014. vol. 3, pp. 178-183. ISSN 18278620.

ALPÍZAR-QUESADA, Carlos Luis y MORALES-ALPÍZAR, Catalina, *La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa.* Acta Médica Costarricense [en línea], 2003. vol. 45, no. 2, pp. 50-56. [Consulta: 2 octubre 2019]. ISSN 0001-6002. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022003000200005.

APAZA, Cristhian y CALIENES, Jimena, 2016. *Extracción y caracterización del alcaloide tropanico Datura Ferox.* Universidad Nacional San Agustín [en línea]. [Consulta: 22 octubre 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/328978293_Extraccion_y_caracterizacion_del_alcaloi_de_tropanico_Datura_Ferox.

ARANGO, Gabriel J., 2008. *Alcaloides y compuestos nitrogenados.* [en línea]. Medellín: [Consulta: 15 enero 2019]. Disponible en: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/856/alcaloides.pdf>.

ASAMBLEA NACIONAL CONSTITUYENTE DEL ECUADOR, 2008. *Constitución del Ecuador.* 2008. Quito: s.n. ISBN 9788578110796.

AYKUL, Senem y MARTINEZ-HACKERT, Erik, *Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis.* Analytical biochemistry [en línea], 2016. vol. 508, pp. 97-103. [Consulta: 17 octubre 2019]. ISSN 1096-0309. DOI 10.1016/j.ab.2016.06.025. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27365221>.

BALDEON, Viviana, 2018. *Evaluación de la actividad inhibitoria del extracto alcaloidal de Phaedoranassa glauciflora sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa* [en línea]. S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. [Consulta: 19 diciembre 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8819/1/56T00759.pdf>.

BASTIDA, Jaume, et. al. *Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids*. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences [en línea], 2011. vol. 661, no. 2, pp. 65-100. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/21374>.

BRAVO, Elizabeth, *La biodiversidad en el Ecuador*. Primera ed. Cuenca: Editorial Universitaria Abya-Yala. 2014. ISBN 9789978101681.

BRUNTON, Laurence L., HILAL-DANDAN, Randa y KNOLLMANN, Bjorn C., *Googman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 13° edición. London: McGraw- Hill Interamericana Editores, S. 2019. ISBN 9788578110796.

CABEZAS, Fabio, ARGOTI, Juan, MARTINEZ, Santiago y CODINA, Carles, *Alcaloides y actividad biológica en Eucharis amazonica, E. grandiflora, Caliphruria subedentata y Crinum kunthianum, especies colombianas de Amaryllidaceae*. Scientia et Technica, 2007. vol. No 33, no. 33, pp. 237-241.

CARRETERO, Marián, *Galantamina*. Medicamentos de vanguardia, 2003. vol. 22, pp. 140-142.

CASTELLANOS CASTILLO, Fabio Andrés, 2014. *Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura - actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano*. S.l.: Universidad Nacional de Colombia.

CLARK, Michelle, FINKEL, Richard, REY, José y WHALEN, Karen, *Farmacología*. 5°. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2012. ISBN 9788415419808.

CORTES, Natalie, et. al. *Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [en línea], 2014. ISSN 0731-7085. DOI 10.1016/j.jpba.2014.09.022. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.022>.

CYTED, 2017. *Detalle proyecto / Red 416RT0511*. PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO [en línea]. [Consulta: 18 septiembre 2019]. Disponible en: http://www.cytcd.org/?q=es/detalle_proyecto&un=909.

ELLMAN, George L., COURTNEY, K. Diane, ANDRES, Valentino y FEATHERSTONE, Robert M., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology, 1961. vol. 7, no. 2, pp. 88-95. ISSN 00062952. DOI 10.1016/0006-2952(61)90145-9.

ELUFIOYE, Taiwo O., et. al. *Actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa de algunas plantas medicinales nigerianas seleccionadas*. Revista brasileira de farmacognosia, 2018. vol. 20, no. 4, pp. 1-6. DOI 10.1590/S0102-695X2010000400002.

GUTIÉRREZ, M. Carmen y DROGUET, Marta, *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor*. Boletín Intexter del Instituto de Investigacion Textil y de Cooperacion Industrial, 2002. no. 122, pp. 35-41. ISSN 11316756.

HOHLFELD, Reinhard y ENDRES, Stefan, *New approaches for the treatment of neurological diseases*. Drug research [en línea], 2018. vol. 63 Suppl 1, pp. 13. [Consulta: 24 octubre 2018]. ISSN 21949379. Disponible en: <https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=aW5mby1mYXJtYWNPYS5jb218aW5mby1mYXJtYWNPYXxneDo0MGEzZDVmNTcyZGVmNmUw>.

INCA, Silvia, 2017. *Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de Phaedranassa dubia* [en línea]. S.l.: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. [Consulta: 19 diciembre 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7927/1/56T00742.pdf>.

JARAMILLO, Tatiana, 2019. *Determinación de la actividad inhibitoria de la fracción alcaloidal de Phaedranassa cuencana, sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa*. S.l.: Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

JIN, Z. y YAO, G., *Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids*. Royal society of chemistry [en línea], 2019. vol. 33, no. Natural Products, pp. 1318-1345. Disponible en: [sci-hub.tw/10.1039/c8np00055g](https://doi.org/10.1039/c8np00055g).

KLEINZ, Matthias y SPENCE, Ian, 2008. *The pharmacology of the autonomic nervous system*. En: J. MADDISON y D. CHURCH (eds.), *Small animal Clinical Pharmacology* [en línea]. Segunda ed. S.l.: W.B. Saunders, pp. 90-96. [Consulta: 15 enero 2019]. ISBN 9780702028588. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702028588500063>.

LABORATORIO DE SISTEMÁTICA DE PLANTAS VASCULARES, 2013. *Familia Amaryllidaceae*. [en línea]. [Consulta: 24 septiembre 2019]. Disponible en: http://www.theCompositaeHut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/amaryllidaceae_amarylidoideae.html.

LAMORAL-THEYS, et. al. *Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design*. Mini-

Reviews in Medicinal Chemistry, 2010. vol. 10, no. 1, pp. 41-50. ISSN 13895575. DOI 10.2174/138955710791112604.

LANE, Roger M., POTKIN, Steven G. y ENZ, Albert, *Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia*. International Journal of Neuropsychopharmacology, 2006. vol. 9, pp. 101-124. DOI 10.1017/S1461145705005833.

LEÓN-YÁNEZ, S., et. al.2011. *Phaedranassa viridiflora*. Libro Rojo de plantas endémicas de Ecuador [en línea]. 2º edición. Quito: Publicaciones de Herbario QCA, pp. 1. [Consulta: 16 septiembre 2019]. Disponible en: [https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/FichaEspecie/Phaedranassa viridiflora](https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/FichaEspecie/Phaedranassa%20viridiflora).

LEÓN, Blanca, et. al.*Amaryllidaceae endémicas del Perú*. Revista Peruana de biología, 2006. vol. 13, no. 2, pp. 690-698.

LIMA, Mariana y LUCCHETTI, Giancarlo, *Tendencias y disparidades en el uso de inhibidores de la colinesterasa para tratar la enfermedad de Alzheimer administrada por el sistema de salud pública brasileño - 2008 a 2014 : un análisis a nivel nacional*. [en línea], 2018. vol. 76, pp. 1-10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/0004-282x20180064>.

LIZAMA BIZAMA, Isabel del Rosario, 2017. *Quimiotaxonomía de Amaryllidaceae chilenas: Alcaloides como marcadores taxonómicos* [en línea]. S.l.: Universidad de Concepción. [Consulta: 15 enero 2019]. Disponible en: http://repositorio.udec.cl/bitstream/handle/11594/2844/Tesis_Quimiotaxonomia_de_Amaryllidaceae.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

LIZAMA BIZAMA, Isabel del Rosario, *Quimiotaxonomía de Amaryllidaceae chilenas alcaloides como marcadores taxonómicos*. [en línea], 2018. [Consulta: 15 enero 2019]. Disponible en: <http://repositorio.udec.cl/handle/11594/2844>.

LÓPEZ, Susana, BASTIDA, Jaume, VILADOMAT, Francesc y CODINA, Carles, *Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts*. Life Sciences, 2002. vol. 71, no. 21, pp. 2521-2529. ISSN 00243205. DOI 10.1016/S0024-3205(02)02034-9.

LOUREIRO GONZÁLEZ, María, 2018. *Neuropsicología de la enfermedad de Alzheimer: Estado y horizonte actuales, y valoración de la eficacia de la estimulación cognitiva* [en línea]. S.l.: Universitat Oberta de Catalunya. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10609/82025>.

MARTÍNEZ, Ana., *El Alzheimer*. S.l.: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2009.

ISBN 9788400088187.

MATTIASSON, Bo y HOLST, Olle, *Extractive bioconversions* [en línea]. Segunda ed. Nueva York: Editorial Marcel Dekker. 1991. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=6heABRW2TZIC&pg=PA261&lpg=PA261&dq=DMSO+alkaloids&source=bl&ots=vmy0KIOUGO&sig=ACfU3U0T3FqLFhkOYNrEF1fBXIMXV5iY1A&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjcw7xi7X1AhUhq1kKHU9OC_o4ChDoATAKegQICRAB#v=onepage&q&f=false.

MCNULTY, James, et.al. *Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters [en línea], 2010. vol. 20, no. 17, pp. 5290-5294. ISSN 0960894X. DOI 10.1016/j.bmcl.2010.06.130. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.06.130>.

MEEROW, Alan W., 1990. *Amaryllidaceae*. En: G. HARLING y L. ANDERSSON (eds.), *Flora of Ecuador*. Göteborg, Stockholm, Quito: s.n.,

MENA, Patricio, *La biodiversidad Ecuador*. [en línea], 2005. pp. 16. Disponible en: <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/49907.pdf>.

MINGA, Danilo, ULLOA, Carmen Ulloa, OLEAS, Nora y VERDUGO, Adolfo, *A new species of Phaedianassa (Amaryllidaceae) from Ecuador*. Phytotaxa, 2015. vol. 192, no. 1, pp. 50-53. ISSN 11793163. DOI 10.11646/phytotaxa.192.1.6.

MONTERO, Evelyn, 2018. *Evaluación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto alcaloidal de Phaedianassa tunguraguae* [en línea]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. [Consulta: 19 diciembre 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8826/1/56T00762.pdf>.

MOSQUERA M, et.al. *Detección in-vitro de inhibidores de la acetilcolinesterasa en extractos de cuarenta plantas de la flora colombiana mediante el método cromatográfico de Ellman*. Scientia Et Technica, 2004. vol. 26, no. 0122-1701, pp. 155-160.

MUSEO NACIONAL DE CIENCIAS NATURALES, [sin fecha]. *ESPECTROMETRIA DE MASAS* [en línea]. Madrid: s.n. [Consulta: 7 octubre 2019]. Disponible en: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf.

NYAMBUYA, Tafadzwa, MAUTSA, Ruvimbo y MUKANGANYAMA, Stanley, *Alkaloid*

extracts from Combretum zeyheri inhibit the growth of Mycobacterium smegmatis. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017. vol. 17, no. 1, pp. 1-11. ISSN 14726882. DOI 10.1186/s12906-017-1636-0.

OLEAS, Nora, 2011. *Landscape Genetics of Phaedranassa Herb . (Amaryllidaceae) in Ecuador* [en línea]. S.l.: Disertacion de doctorado. Florida International University. Disponible en:

<https://digitalcommons.fiu.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.com/&httpsredir=1&article=1538&context=etd>.

OLEAS, Nora, 2014. *Pululahua: la floresta en el volcán*. Reserva geobotánica Pululahua [en línea]. [Consulta: 16 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.pressreader.com/>.

OLEAS, Nora, *Phaedranassa viridiflora*. Red List, 2015. vol. 8235.

OLEAS, Nora, MEEROW, Alan W. y FRANCISCO-ORTEGA, Javier, *Molecular Markers and Conservation of Plant Species in the Latin-America: The Case of Phaedranassa viridiflora (Amaryllidaceae)*. Botanical Review, 2013. vol. 79, no. 4, pp. 507-527. ISSN 00068101. DOI 10.1007/s12229-013-9125-8.

OLEAS, Nora, ZWECK, Justin, MORENO, Mauro y PEÑA, Paola, *Speciation as a result of hybridization between genera of Amaryllidaceae in the tropical Andes hotspot*. Botany [en línea], 2018. [Consulta: 18 noviembre 2019]. Disponible en: <http://2018.botanyconference.org/engine/search/index.php?func=detail&aid=857>.

OMS, 2017. *Demencia*. Datos y cifras demencia [en línea]. [Consulta: 29 noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

ORTIZ, Javier E., et.al. *Wild argentinian amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids*. Molecules [en línea], 2012. vol. 17, no. 11, pp. 13473-13482. [Consulta: 15 septiembre 2019]. ISSN 14203049. DOI 10.3390/molecules171113473. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23149565>.

ORTIZ, Javier E., et.al. *Cholinesterase-inhibitory effect and in silico analysis of alkaloids from bulbs of Hieronymiella species*. Phytomedicine [en línea], 2018. vol. 39, pp. 66-74. ISSN 1618095X. DOI 10.1016/j.phymed.2017.12.020. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.12.020>.

ORTIZ, Javier E., et.al. *Alkaloids from Hippeastrum argentinum and Their Cholinesterase-Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study*. Journal of Natural Products, 2016. vol. 79,

no. 5, pp. 1241-1248. ISSN 15206025. DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b00785.

PAGLIOSA, L.B., et.al. *Effect of isoquinoline alkaloids from two Hippeastrum species on in vitro acetylcholinesterase activity*. Phytomedicine [en línea], 2010. vol. 17, no. 8-9, pp. 698-701. ISSN 09447113. DOI 10.1016/j.phymed.2009.10.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.003>.

PELLEGRINO, Simone, et.al. *The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth*. Structure, 2018. vol. 26, no. 3, pp. 416-425.e4. ISSN 18784186. DOI 10.1016/j.str.2018.01.009.

PERALTA, Luis, 2014. *Cultivo in vitro de tejidos vegetales de plantas del género Zephyranthes y evaluación de su producción de alcaloides*. [en línea]. S.l.: Universidad ICESI. [Consulta: 23 octubre 2019]. Disponible en: http://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/76971/1/peralta_cultivo_invitro_2014.pdf.

PEREZ, SERRANO, José Ma, 2005. *Marcadores neurofisiológicos precoces en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer* [en línea]. S.l.: Universidad Complutense de Madrid. [Consulta: 15 enero 2019]. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/espochsp/reader.action?docID=3160623&query=alzheimer>.

PÉREZ, Cruz, 2009. *ProQuest Ebook Centr Enfermedad de Alzheimer del diagnóstico a la terapéutica*. En: EL CID (ed.), *Enfermedad de Alzheimer del diagnóstico a la terapéutica* [en línea]. primera. S.l.: s.n., pp. 24. [Consulta: 15 enero 2019]. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/espochsp/reader.action?docID=3182666&query=alzheimer>.

PRENSA, Silvia, 2015. *Fuentes de Galantamina para el Alzheimer*. Proyecto de investigación de la UNSJ [en línea]. [Consulta: 11 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.suplementos.unsj.edu.ar/octubre73/?p=127>.

PRINCE, Prof Martin, ALI, Gemma-claire y GUERCHET, Maelenn, *World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia*. Alzheimer's disease international [en línea], 2015. Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>.

RANG, H.P., RITTER, J.M., FLOWER, R.J. y HENDERSON, G., *Farmacologia Rang y Dale*. Octava edi. BARCELONA: Elsevier. 2016. ISBN 9780702053627.

RARE PLANTS, 2018. *Phaedranassa viridiflora*. Phaedranassa [en línea]. [Consulta: 14 enero 2019]. Disponible en: <https://www.rareplants.co.uk/product/phaedranassa-viridiflora-2/>.

SALAZAR, Cristina, 2017. *DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE Phaedranassa cinerea*. S.l.: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.

SNELL, Richard, *Neuroanatomía clínica*. Séptima ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. 2010. ISBN 9788416004188.

SOTO, Marilú y LEIVA, Milagros, *Estudio exomorfológico y fitoquímico de los bulbos de dos especies endémicas del Perú de Amaryllidaceae*. Arnaldoa, 2015. vol. 22, no. 1, pp. 269 – 288.

STEVENS, P., 2001. *ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE* [en línea]. 2001. Missouri: s.n. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

TROPICOS.ORG, [sin fecha]. *Phaedranassa viridiflora*. Jardin Botanico de Missouri [en línea]. [Consulta: 13 enero 2019]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/1200655?tab=specimens>.

UNNE, 2010. *Angiospermas* [en línea]. 2010. S.l.: s.n. [Consulta: 15 septiembre 2019]. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Monocotiled%F3neas/7-Asparagales/3-Amaryllidaceae.pdf>.

VALENCIA, Alberto Duvan, 2015. *Detección in vitro de inhibidores de la acetilcolinesterasa en plantas de la flora clombiana por el método de Ellman*. S.l.: Universidad tecnológica de Pereira.

VINUEZA, Angél Gabriel, 2014. *Tamizaje fitoquímico e identificación de alcaloide de Phaedranassa schizanta Baker*. S.l.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

YAR, Muhammad, et.al. *Synthesis and DPPH scavenging assay of reserpine analogues , computational studies and in silico docking studies in AChE and BChE responsible for Alzheimer 's disease.* , 2015. vol. 51.

ANEXOS

Anexo A Recolección del material vegetal



Posible híbrido *P. dubia* x *P. viridiflora*, de flores naranjas y *P. viridiflora* de flores amarillas, respectivamente.

Fuente: Oleas, N. 2019



Reserva Geobotánica del Pululahua,
Pichincha, Ecuador.

Fuente: Oleas, N. 2019

Anexo B Acondicionamiento del material vegetal



Cortes de las capas en 3 cm y su posterior
secado



Muestra triturada



Pesado de la muestra

Anexo C Proceso de extracción de alcaloides



Periodos de sonicación durante la maceración



Empleo de rotavapor a presión reducida



La muestra y goma arabiga



Alcaloides de *P. viridiflora* de flor naranja y
P. viridiflora de flor amarilla,
respectivamente



Traspaso de los alcaloides al vial

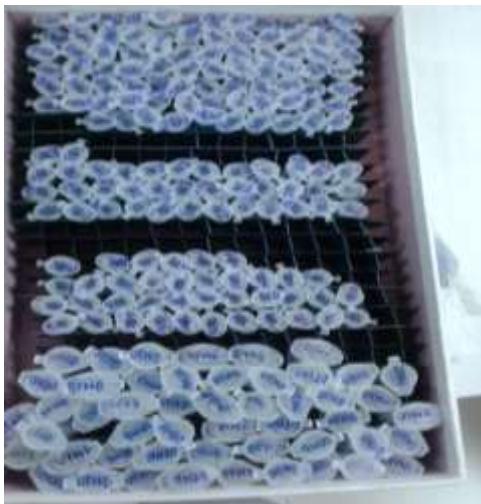


Extracto puro de *Phaedranassa viridiflora* de flor naranja



Extracto puro de *Phaedranassa viridiflora* de flor amarilla

Anexo D Preparación de reactivos

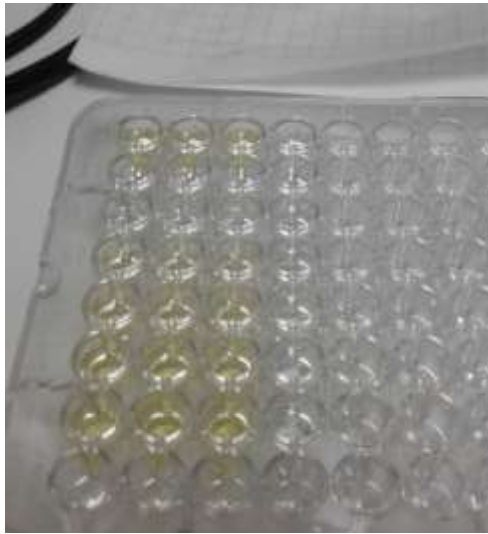


Preparación de enzimas y sustratos



Preparación de galantina

Anexo E Microplaca de 96 pocillos después del ensayo in-vitro

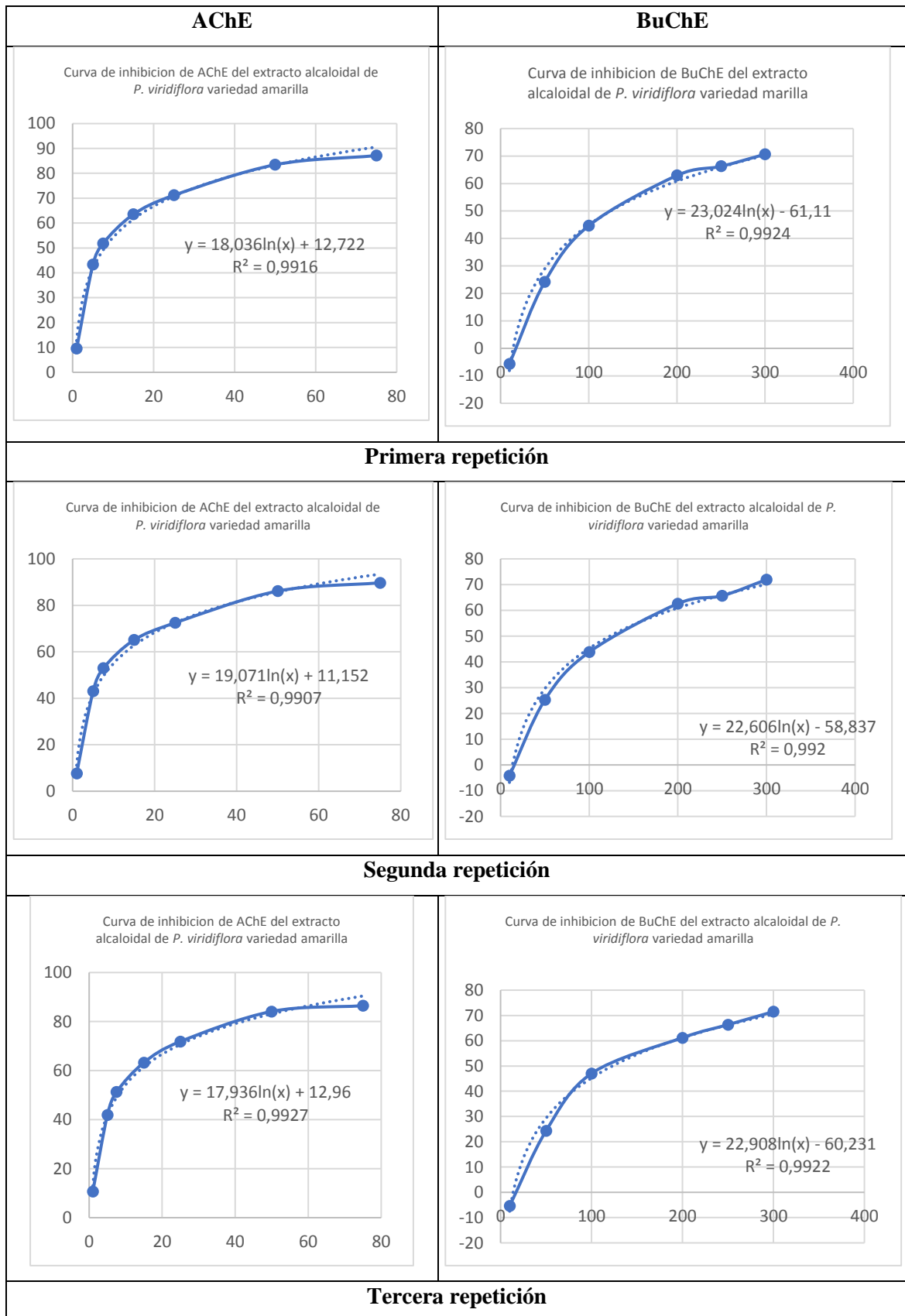


Primer análisis – Dilución 1

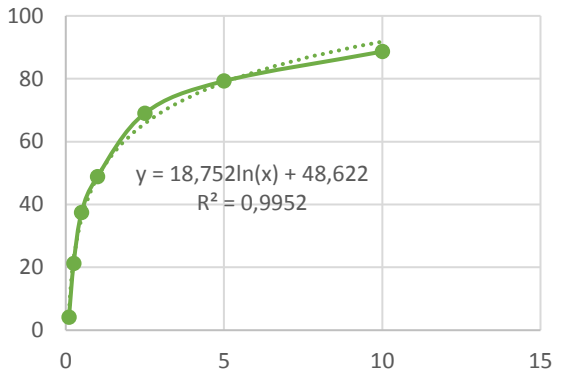
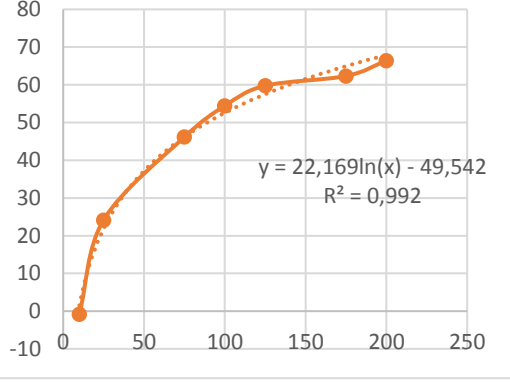
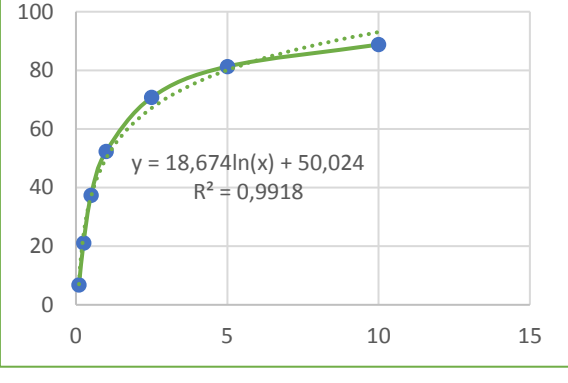
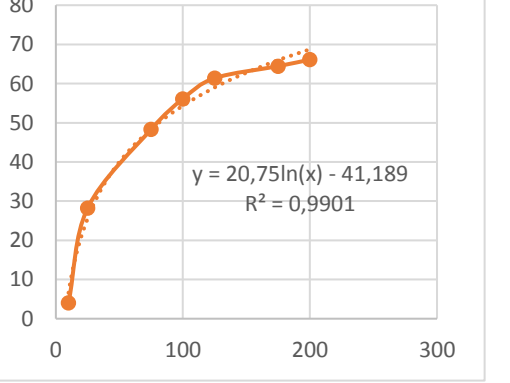
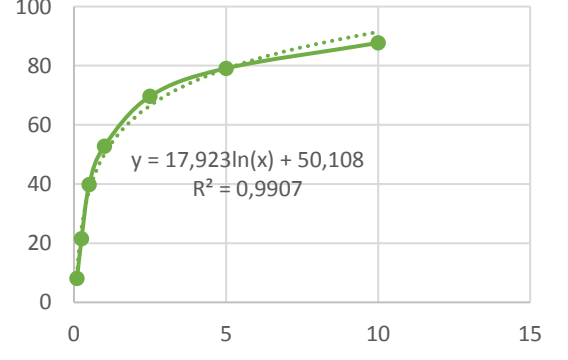
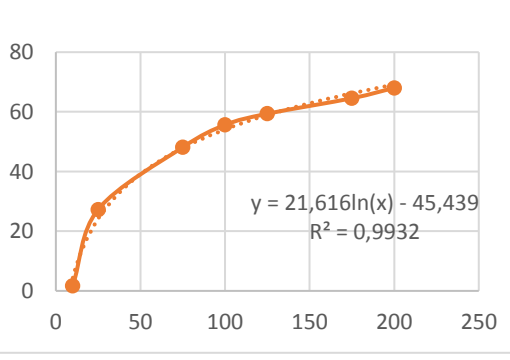


Dilución 2

Anexo F Curva de inhibición de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora* de variedad amarilla



Anexo G Curva de inhibición de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de *Phaedranassa viridiflora* de variedad naranja

AChE	BuChE
<p>Curva de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>P. viridiflora</i> variedad naranja</p>  <p>$y = 18,752\ln(x) + 48,622$ $R^2 = 0,9952$</p>	<p>Curva de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>P. viridiflora</i> variedad naranja</p>  <p>$y = 22,169\ln(x) - 49,542$ $R^2 = 0,992$</p>
Primera repetición	
<p>Curva de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>P. viridiflora</i> variedad naranja</p>  <p>$y = 18,674\ln(x) + 50,024$ $R^2 = 0,9918$</p>	<p>Curva de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>P. viridiflora</i> variedad naranja</p>  <p>$y = 20,75\ln(x) - 41,189$ $R^2 = 0,9901$</p>
Segunda repetición	
<p>Curva de inhibición de AChE del extracto alcaloidal de <i>P. viridiflora</i> variedad naranja</p>  <p>$y = 17,923\ln(x) + 50,108$ $R^2 = 0,9907$</p>	<p>Curva de inhibición de BuChE del extracto alcaloidal de <i>P. viridiflora</i> variedad naranja</p>  <p>$y = 21,616\ln(x) - 45,439$ $R^2 = 0,9932$</p>
Tercera repetición	

Anexo H Contrato marco de acceso a los recursos genéticos

	MINISTERIO DEL AMBIENTE																			
GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRES Nro. 022 -FLO-2019-DPAP-MA																				
Fecha de emisión: 25 de noviembre 2019.																				
Fecha de movilización: 27 de diciembre 2019 Válido hasta: 28 de diciembre 2019																				
<p>La Dirección Provincial de: Pichincha, autoriza a: Nora Oleas, curadora del Herbario de la Universidad Tecnológica Indoamérica UTI, la movilización de especímenes de: flora silvestre, desde: la provincia de Pichincha, Quito DM, Herbario HUTI, hacia: provincia de Chimborazo, al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Politécnica del Chimborazo, de acuerdo a la lista adjunta:</p>																				
<table border="1"><thead><tr><th>Clase</th><th>Familia</th><th>Nombre científico</th><th>Nativa/ Endémica/ Introducida</th><th>Apéndice CITES</th><th>Lista Roja IUCN</th><th>Lista Roja en Ecuador</th><th>Elementos constitutivos</th><th>No.</th></tr></thead><tbody><tr><td>Equisetopsida</td><td>Amaryllidaceae</td><td>por identificar</td><td>indeterminado</td><td>Indeterminado</td><td>NO</td><td>NO</td><td>Bulbos</td><td>5</td></tr></tbody></table>	Clase	Familia	Nombre científico	Nativa/ Endémica/ Introducida	Apéndice CITES	Lista Roja IUCN	Lista Roja en Ecuador	Elementos constitutivos	No.	Equisetopsida	Amaryllidaceae	por identificar	indeterminado	Indeterminado	NO	NO	Bulbos	5		
Clase	Familia	Nombre científico	Nativa/ Endémica/ Introducida	Apéndice CITES	Lista Roja IUCN	Lista Roja en Ecuador	Elementos constitutivos	No.												
Equisetopsida	Amaryllidaceae	por identificar	indeterminado	Indeterminado	NO	NO	Bulbos	5												
Los especímenes o elementos constitutivos se movilizarán en:																				
Vehículo: Transporte privado																				
Los especímenes van en calidad de:																				
Custodia permanente, investigación científica No. MAE-DNB-2015-0054																				
Responsable: Karen Acosta CI: 1003089016																				
Firma de responsabilidad por la expedición: 																				
Abg. Evelyn Chaves Montenegro Directora Provincial del Ambiente Pichincha																				
Firma del beneficiario: _____																				
Nora Oleas																				
AV. Amazonas N24-196 Y Luis Cordero																				
Telf.: 02-3816230																				



MAE – DNB – CM – 2015 – 0054

COMPARECIENTES:

A la suscripción del presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos comparecen, por una parte el Ministerio del Ambiente, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural, legalmente representado por el Biólogo Francisco José Prieto Albuja, en su calidad de Subsecretario de Patrimonio Natural, delegado de la máxima autoridad conforme se desprende del Acuerdo Ministerial Nro. 024 de 09 de marzo de 2016, publicado en el Registro Oficial Nro. 725 de 04 de abril de 2016, a quien en adelante se le denominará "MAE"; y, por otra parte, la Universidad Tecnológica Indoamérica, debidamente representada por el Doctor Franklin Edmundo Tapia Defaz, en su calidad de Rector, conforme se desprende del Nombramiento de Autoridad Nro. 007-2015 de 15 de julio de 2015, certificado el 23 de diciembre de 2016 por el Doctor Pablo Suarez Secretario Procurador de la Universidad Tecnológica Indoamérica, que se agrega como documento habilitante y a quien en adelante se le denominará "UTI";

Las partes convienen en celebrar, el presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos respecto de la solicitud del proyecto de investigación científica denominado "La biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible", contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES.-

1. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 3, numeral 7 y 83, numerales 6 y 13 establece como deberes y responsabilidades del Estado y de sus habitantes el resguardo del patrimonio cultural y natural del país, así como también el respeto a los derechos de la naturaleza, la preservación de un ambiente sano y utilización de los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible.
2. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 14, 74, 276, 276, 387, 388 reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*. Declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados. Además, establece como un requerimiento para el buen vivir, que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades gocen efectivamente de sus derechos, y ejerzan responsabilidades en el marco de la interculturalidad, del respeto a sus diversidades, y de la convivencia armónica con la naturaleza.
3. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 313 y 400 establecen que el Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad y el patrimonio genético, considerados sectores estratégicos, sobre los cuales el Estado se reserva el derecho de administrar, regular, controlar y gestionar de acuerdo a los principios de sostenibilidad ambiental, precaución, prevención y eficiencia.
4. La Constitución de la República del Ecuador, en el artículo 322 reconoce la propiedad intelectual de acuerdo con las condiciones que señale la ley, así como prohíbe toda forma de apropiación en el ámbito de las ciencias, tecnologías, saberes ancestrales y sobre los recursos genéticos que contienen la diversidad biológica y la agrobiodiversidad.
5. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 385, 386, 387 y 388, establece como una

SS/WR/RA/J/ER/EN

Calle Madrid 1139 y Andalucía Código Postal: 170517 / Quito – Ecuador. Teléfono: 593-2 388-7090